

JP1997149790A

1997-6-10

**Bibliographic Fields**

**Document Identity**

(19)【発行国】

日本国特許庁(JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報(A)

(11)【公開番号】

特開平9-149790

(43)【公開日】

平成9年(1997)6月10日

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application]

Japan Unexamined Patent Publication Hei 9- 149790

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1997 (1997) June 10\*

**Public Availability**

(43)【公開日】

平成9年(1997)6月10日

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

1997 (1997) June 10\*

**Technical**

(54)【発明の名称】

新規セリンプロテアーゼ

(51)【国際特許分類第 6 版】

C12N 15/09 ZNA

C07H 21/04

C07K 14/47

C12N 1/21

5/10

9/52

// A61K 38/46

(C12N 15/09 ZNA

C12R 1:91 )

(C12N 1/21

C12R 1:19 )

(C12N 9/52

C12R 1:19 )

(C12N 9/52

C12R 1:91 )

【FI】

C12N 15/00 ZNA A 9162-4B

C07H 21/04 B

(54) [Title of Invention]

**NOVEL SERINE PROTEASE**

(51) [International Patent Classification, 6th Edition]

C12N 15/09 ZNA

C07H 21/04

C07K 14/47

C12N 1/21

5/10

9/52

// A61K 38/46

(C12N 15/09 ZNA

C12R 1:91 )

(C12N 1/21

C12R 1:19 )

(C12N 9/52

C12R 1:19 )

(C12N 9/52

C12R 1:91 )

[FI]

C12N 15/00 ZNA A 9162-42-

C07H 21/04 B

**JP1997149790A**

**1997-6-10**

C07K 14/47

C07K 14/47

C12N 1/21

C12N 1/21

9/52

9/52

C12N 5/00 B

C12N 5/00 B

A61K 37/54

A61K 37/54

【請求項の数】

[Number of Claims]

7

7

【出願形態】

[Form of Application]

FD

FD

【全頁数】

[Number of Pages in Document]

16

16

**Filing**

【審査請求】

[Request for Examination]

未請求

Unrequested

(21)【出願番号】

(21) [Application Number]

特願平8-212196

Japan Patent Application Hei 8- 212196

(22)【出願日】

(22) [Application Date]

平成8年(1996)7月24日

1996 (1996) July 24\*

**Foreign Priority**

(31)【優先権主張番号】

(31) [Priority Application Number]

特願平7-275105

Japan Patent Application Hei 7- 275105

(32)【優先日】

(32) [Priority Date]

平7(1995)9月29日

\*7 (1995) September 29\*

(33)【優先権主張国】

(33) [Priority Country]

日本(JP)

Japan (JP)

**Parties**

**Applicants**

(71)【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】

[Identification Number]

000001904

000001904

【氏名又は名称】

[Name]

サントリー株式会社

**SUNTORY LIMITED**

【住所又は居所】

[Address]

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

Osaka Prefecture Osaka City Kita-ku Dojimahama 2-1-40

JP1997149790A

1997-6-10

**Inventors**

(72)【発明者】

【氏名】

鶴岡 伸夫

【住所又は居所】

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内

(72) [Inventor]

[Name]

Tsuruoka Nobuo

[Address]

Osaka Prefecture Mishima-gun Shimamoto-cho  
Wakayamadai 1-1-1 Suntory Institute for Biomedical  
Research \*

(72)【発明者】

【氏名】

山城 恭子

【住所又は居所】

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内

(72) [Inventor]

[Name]

Yamashiro Kyoko

[Address]

Osaka Prefecture Mishima-gun Shimamoto-cho  
Wakayamadai 1-1-1 Suntory Institute for Biomedical  
Research \*

(72)【発明者】

【氏名】

辻本 雅文

【住所又は居所】

埼玉県朝霞市三原町1丁目11番12号 ガーデ  
ンコート志木311

(72) [Inventor]

[Name]

Tsujimoto Masafumi

[Address]

Saitama Prefecture Asaka City Mihara \*1-Chome 11-12  
Garden Court Shiki 311

(72)【発明者】

【氏名】

山口 希

【住所又は居所】

京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御  
霊口町285-79

(72) [Inventor]

[Name]

Yamaguchi \*

[Address]

Kyoto Prefecture Kyoto City Kita-ku \*\*\*\*\*jp11  
\*\*\*\*\*285- 79

**Agents**

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】

石田 敬（外3名）

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

[Name]

Ishida Takashi (3 others )

**Abstract**

(57)【要約】

【課題】

新規なアミノ酸配列の提供。

【解決手段】

(57) [Abstract]

[Problems to be Solved by the Invention]

Offer of novel amino acid sequence .

[Means to Solve the Problems]

配列番号:3 に示すアミノ酸番号 1~223 のアミノ酸配列を有するセリンプロテアーゼ。

#### Claims

##### 【特許請求の範囲】

##### 【請求項 1】

配列番号:3 に示すアミノ酸番号 1 から 223 までのアミノ酸配列(但し、アミノ酸番号 1 のロイシンは欠失していてもよい)、配列番号:4 に示すアミノ酸番号 1 から 233 までのアミノ酸配列もしくは配列番号:5 に示すアミノ酸番号 1 から 241 までのアミノ酸配列を含んで成るセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

##### 【請求項 2】

配列番号:3 に示すアミノ酸番号 1 から 223 までのアミノ酸配列(但し、アミノ酸番号 1 のロイシンは欠失していてもよい)、配列番号:4 に示すアミノ酸番号 1 から 233 までのアミノ酸配列もしくは配列番号:5 に示すアミノ酸番号 1 から 241 までのアミノ酸配列を含んで成るセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドをコードする DNA。

##### 【請求項 3】

配列番号:3 のヌクレオチド番号 219~887、同 222~887、配列番号:4 のヌクレオチド番号 1~699 もしくは配列番号:5 のヌクレオチド番号 1~723 のヌクレオチド配列またはその部分ヌクレオチド配列を含んで成る、請求項 2 に記載の DNA。

##### 【請求項 4】

請求項 2 又は 3 に記載の DNA を含んで成る組換えベクター。

##### 【請求項 5】

請求項 4 に記載の組換えベクターにより形質転換された宿主。

##### 【請求項 6】

請求項 1 に記載のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドの製造方法において、請求項 5 に記載の宿主を培養し、培養物から前記セリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを採取することを特徴とする方法。

##### 【請求項 7】

請求項 1 に記載のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを用いる阻害物質のスクリーニング方法は

serine protease . which possesses amino acid sequence of amino acid number 1~223 which is shown in the Sequence Number :3

##### [Claim(s)]

##### [Claim 1]

amino acid sequence to amino acid number 1 to 2 23 which is shown in Sequence Number :3 (However, leucine of amino acid number 1 had could have been deficient), including the amino acid sequence to amino acid number 1 to 2 33 which is shown in Sequence Number :4, or amino acid sequence to the amino acid number 1 to 2 41 which is shown in Sequence Number :5 serine protease which becomes or the portion peptide .

##### [Claim 2]

amino acid sequence to amino acid number 1 to 2 23 which is shown in Sequence Number :3 (However, leucine of amino acid number 1 had could have been deficient), including the amino acid sequence to amino acid number 1 to 2 33 which is shown in Sequence Number :4, or amino acid sequence to the amino acid number 1 to 2 41 which is shown in Sequence Number :5 serine protease which becomes or DNA . which portion peptide code is done

##### [Claim 3]

Including nucleotide number 1~699 of nucleotide number 219~887, same 222 - 887, Sequence Number :4 of Sequence Number :3, or nucleotide sequence or portion nucleotide sequence of nucleotide number 1~723 of Sequence Number :5 DNA . which becomes, states in Claim 2

##### [Claim 4]

Including DNA which is stated in Claims 2 or 3 , recombinant vector . which becomes

##### [Claim 5]

With recombinant vector which is stated in Claim 4 transformation host . which is done

##### [Claim 6]

method . which designates that culture it does host which is stated in Claim 5 serine protease which is stated in Claim 1 or in the manufacturing method of portion peptide , from culture aforementioned serine protease or the portion peptide it recovers as feature

##### [Claim 7]

serine protease which is stated in Claim 1 or screening method . of inhibitor which uses portion peptide

ング方法。

## Specification

### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、新規セリンプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、及び該セリンプロテアーゼの製造方法、並びに該セリンプロテアーゼを用いる阻害物質のスクリーニング方法に関する。

#### 【0002】

#### 【従来の技術】

セリンプロテアーゼは、動物、植物、微生物に広く存在し、特に、高等動物では、食物の消化、血液凝固・線溶、補体活性化、ホルモン産生、排卵・受精、食作用、細胞増殖、発生・分化、老化、癌転移など極めて多くの生体反応に関与していることがわかっている(Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984)。

また、高等動物におけるセリンプロテアーゼは、その活性中心の一次構造から、キモトリプシン族およびサブチリシン族に大別される。

キモトリプシン族においては、その活性発現のために、活性中心のセリン残基のほかにヒスチジン残基が必須であり、また、セリン残基やヒスチジン残基の近傍のアミノ酸配列がよく保存されていることが知られている。

#### 【0003】

従って、これら保存された領域を使って PCR 法によりセリンプロテアーゼ遺伝子をクローニングする試みもなされている。

すなわち、PCR プライマーとして、セリンプロテアーゼにおいてよく保存されているヒスチジン残基近傍のアラニン- アラニン- ヒスチジン- システイン (AAHC) ならびにセリン残基近傍のアスパラギン酸- セリン- グリシン- グリシン- プロリン (DSGGP)を用いて、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離したことが報告されている。

#### 【0004】

例えば、Sakanari らは、線虫および原虫からラットトリプシン II と 67% の類似性をもつセリンプロテアーゼ遺伝子を単離した(Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S. and McKerrow, J. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86,

### [Description of the Invention]

#### [0001]

#### [Technological Field of Invention]

this invention regards manufacturing method , of gene , and said serine protease which novel serine protease , that code are done and screening method of inhibitor which uses the said serine protease .

#### [0002]

#### [Prior Art]

serine protease exists widely in animal , plant , microorganism , especially, with higher animal , digestion , blood coagulation \* fibrinolysis , assistant body activation and hormone production of food , such as ovulation \* fertilization , phagocytosis , cell growth , occurrence & differentiation , aging and metastasis it understands that it has participated in quite many bodily reaction , (Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984 ) .

In addition, serine protease in higher animal , from primary structure of activity center , is roughly classified to chymotrypsin (EC 3.4.21.1 ) family and subtilisin (EC 3.4.21.62) family .

Regarding chymotrypsin (EC 3.4.21.1 ) family, because of activity expression , histidine residue being necessary to other than serine residue of activity center , in addition, it is known that amino acid sequence of vicinity of serine residue and histidine residue is well retained.

#### [0003]

Therefore, these using region which is retained, also attempt which cloning it does serine protease gene has done with PCR method .

It is reported that novel serine protease gene is isolated alanine - alanine - histidine - cysteine of histidine residue vicinity which is retained well as namely, PCR primer , putting to serine protease (AAHC ) and making use of aspartic acid - serine - glycine - glycine - proline (DSGGP ) of serine residue vicinity .

#### [0004]

for example Sakanari and others isolated rat trypsin (EC 3.4.21.4 ) II and serine protease gene which has 67% similarity from nematode and protozoan (Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S. and McKerrow, J. H., Proceedings of the National Academy of Sciences of the

4863-4867, 1989)。

また、Mueller-Hill のグループは、ラット膵臓からラットトリプシン V およびラットエラスターゼ IV を単離し (Kang, J., Wiegand, U. and Mueller-Hill, B., Gene, 110, 181-187, 1992)、また、同じグループで、ヒト脳よりヒトトリプシン IV を単離した (Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Mueller-Hill, B., Gene, 136, 167-175, 1993)。

#### 【0005】

しかしながら、これら先行文献においては、線虫や原虫ならびに膵臓や脳の組織由来の cDNA をもとに単離されている。

また、このような PCR プライマーを用いて単離されたセリンプロテアーゼ遺伝子は、ザイモージェンとして存在するため、セリンプロテアーゼ活性を持つタンパク質をコードする遺伝子であるかどうかの確認まで至っていないのが現状である。

さらに、線虫や原虫ならびに臓器ばかりでなく、培養により増殖させることが可能な各種株化癌細胞の cDNA を使うことができれば、セリンプロテアーゼ遺伝子の単離がより容易になることは想像に難くないが、血清添加した培養細胞の上清ではセリンプロテアーゼ活性を測定することができないのが実状である。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記の実情に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なセリンプロテアーゼ、及びそれをコードする新規セリンプロテアーゼ遺伝子を提供することにある。

さらに、本発明は当該遺伝子を用いて当該プロテアーゼを大量に生産する方法及び該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離するための出発材料として、ヒト結腸癌 COLO 201 細胞に着目した。

すなわち、本発明者らは、COLO 201 細胞を無タンパク質培地で培養した培養上清中にセリンプロテアーゼ酵素活性を認め、このような新規セリンプロテアーゼ遺伝子の単離のためには、COLO 201 細胞のような癌細胞から調製した cDNA を用いることが有効であることを発見し

United States of America, 86, 4863-4867, 1989)。

In addition, group of Mueller-Hill isolated rat trypsin (EC 3.4.21.4) V and rat elastase IV from rat pancreas and (Kang, J., Wiegand, U. and Mueller-Hill, B., Gene (0378 - 1119, GENED6), 110, 181 - 187 and 1992), in addition, with same group, isolated human trypsin (EC 3.4.21.4) IV from human brain (Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Mueller-Hill, B., Gene (0378 - 1119, GENED6), 136, 167 - 175 and 1993).

#### 【0005】

But, it is isolated on basis of cDNA of tissue derivation of nematode and protozoan and pancreas and brain regarding these prior literature.

In addition, as for serine protease gene which is isolated making use of the PCR primer a this way, because it exists zymogen as, fact that it has not reached to verification whether or not it is a gene which the protein which has serine protease activity code is done of, is present state.

Furthermore, if can use cDNA of possible various strain conversion cancer cell, that it multiplies not only a nematode and a protozoan and a organ, with culture isolation of serine protease gene as for becoming easy is not more difficult in imagination. blood serum with supernatant of cell line which is added fact that it is not possible to measure serine protease activity, is actual condition.

#### 【0006】

##### 【Problems to be Solved by the Invention】

As for this invention considering to above-mentioned actual condition, being something which it is possible, objective novel serine protease, and that the code is to offer novel serine protease gene which is done.

Furthermore, this invention is something which designates that screening method of specific inhibitor which uses method and said enzyme which produce this said protease in large scale making use of this said gene is offered as objective.

#### 【0007】

##### 【Means to Solve the Problems】

As for these inventors, you paid attention to human colon cancer COLO 201 cell as starting material in order to isolate novel serine protease gene.

namely, these inventors COLO 201 cell with non protein culture medium recognized serine protease enzyme activity in the culture supernatant which culture is done for isolating novel serine protease gene a this way, discovered fact that it is effective to use cDNA which is manufactured from cancer cell like COLO 201 cell.

た。

かつ、単離した遺伝子が真に酵素活性をコードする遺伝子であるかどうかを確認するために、成熟タンパク質として発現することに成功し、本発明を完成させるに至った。

【0008】

【発明の実施の形態】

ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞 (ATCC CCL-224) は、動物細胞の培養に常用されている任意の方法により培養することができる。

かつ、タンパク質を全く含まない培地を用いて静置培養することも可能である。

具体例を実施例 1 に記載する。

【0009】

培養上清中の酵素活性測定法は、市販の合成基質に 7-アミノ-4-メチルクマリンや p-ニトロアニリドなどを結合させたものを用いて、容易に測定することができる。

具体例を実施例 2 に記載する。

この結果、ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞の培養上清中には、明らかにセリンプロテアーゼ酵素活性を認めた。

そこで、本酵素活性を含め、ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞に発現しているすべてのセリンプロテアーゼ遺伝子を単離することを目的として、以下の実験を行った。

すなわち、ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞から mRNA を単離精製し、cDNA ライブラリーを作製した。

作製した cDNA ライブラリーからセリンプロテアーゼモチーフをもとにデザインした PCR プライマーを用いて PCR によるスクリーニングを行い、得られた PCR 産物をサブクローニングした。

【0010】

その結果、活性残基であるセリンおよびヒスチジン間にもセリンプロテアーゼに保存されているアミノ酸をコードする塩基配列を含むクローンが確認された。

こうして得られた遺伝子をプローブとして、常法により全長の遺伝子をクローニングした結果、SP59 遺伝子、SP60 遺伝子および SP67 遺伝子を単離し、新規セリンプロテアーゼを確認することになった。

At same time, in order to verify whether or not gene which isolated truly is gene which enzyme activity code is done, itsucceeded in revealing as mature protein this invention reached to completion.

[0008]

[Embodiment of the Invention]

COLO 201cell (ATCC CCL-224 ) of human colon cancer derivation culture is possible with method of option which is regularly used to culture of animal cell .

Also it is possible making use of culture medium which does not include the protein completely at same time, stationary culture to do.

embodiment is stated in Working Example 1.

[0009]

It can measure enzyme activity measurement method in culture supernatant , easily 7 -amino -4- methyl coumarin and making use of those which connect p- nitro anilide etc to commercial synthetic substrate .

embodiment is stated in Working Example 2 .

this result, serine protease enzyme activity was recognized clearly in culture supernatant of the COLO 201cell of human colon cancer derivation.

Then, experiment below was done with fact that all serine protease gene which include this enzyme activity , have revealed in COLO 201cell of human colon cancer derivation are isolated as objective .

mRNA isolation and purification was done from COLO 201cell of namely, human colon cancer derivation, the cDNA library was produced.

screening was done with PCR making use of PCR primer which the design is done on basis of serine protease motif from cDNA library which it produces, PCR product which is acquired subcloning was done.

[0010]

As a result, code is done clone which includes nucleotide sequence which was verified amino acid which even between serine and the histidine which are a activity residue is retained in serine protease .

In this way, it isolated result, SP59gene , SP60gene and SP67gene which the gene of total length cloning are done with gene which is acquired as probe , with conventional method , could verify novel serine protease .

とが出来た。

具体例を実施例 3 に記載する。

[0011]

以上の結果、本発明者らは、ヒト結腸癌由来 COLO 201 細胞の cDNA から、既知のセリンプロテアーゼと類似性が 30%未満である新規セリンプロテアーゼ遺伝子 (SP59 遺伝子、SP60 遺伝子および SP67 遺伝子) の単離に成功した。

また、単離した新規セリンプロテアーゼ遺伝子をプローブとして、ヒト臓器での mRNA の発現を確認したところ、SP59 遺伝子、SP60 遺伝子および SP67 遺伝子ともヒト臓器での発現が認められ、SP59 遺伝子は特に脳において強い発現を認め、約 1.4kb の大きさであった。

具体例を実施例 4 に記載する。

このことから、単離された新規セリンプロテアーゼ遺伝子は、ヒト臓器でも発現していることが確認された。

[0012]

また、単離した新規セリンプロテアーゼ遺伝子の構造から、成熟タンパク質として動物細胞で発現する方法を考案した。

すなわち、代表的なセリンプロテアーゼであるトリプシンは、プロ体であるトリプシノーゲンとして発現した後、十二指腸粘膜に分布する酵素エンテロキナーゼの作用によりイソロイシンを N 末端アミノ酸とする成熟活性タンパク質として存在することが知られている。

[0013]

そこで、SP59 遺伝子の成熟タンパク質をコードすると考えられる遺伝子の前にトリプシン遺伝子のシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を繋いだキメラ遺伝子(Trp59 遺伝子) を作製した。

作製したキメラ遺伝子である Trp59 遺伝子を COS-1 細胞にトランスフェクションした後、COS-1 細胞の培養上清にエンテロキナーゼを作用させた結果、セリンプロテアーゼ酵素活性を確認した。

具体的手法を実施例 5 に記載する。

[0014]

以上の結果から、今回単離したセリンプロテアーゼ遺伝子は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼ遺伝子であることが明らかとなった

embodiment is stated in Working Example 3.

[0011]

Result above, these inventors from cDNA of human colon cancer derivative COLO 201 cell ,succeeded in isolation of novel serine protease gene (SP59gene , SP60gene and SP67gene ) where known serine protease and similarity are under 30%.

In addition, when revelation of mRNA with human organ was verified with novel serine protease gene which is isolated as probe , also SP59gene , SP60gene and the SP67gene were recognized revelation with human organ , SP59gene recognized strong revelation in especially brain , it was a size of approximately 1.4 kb .

embodiment is stated in Working Example 4.

From now on, as for novel serine protease gene which is isolated, it was verified that it has revealed even with human organ .

[0012]

In addition, method which is revealed with animal cell from structure of novel serine protease gene which is isolated, as mature protein was devised.

trypsin (EC 3.4.21.4 ) which is a namely, representative serine protease is professional body, it is informed that it exists as maturity activity protein which designates isoleucine as the N-terminal amino acid trypsinogen as after revealing, by action of enzyme enterokinase which the distribution is done in duodenum mucosa .

[0013]

Then, chimeric gene (Trp59gene ) which connects gene which signal sequence and enterokinase recognition sequence of trypsin (EC 3.4.21.4 ) gene code is done was produced before the gene which is thought that mature protein of SP59gene code is done.

Trp59 gene which is a chimeric gene which it produces transfection after doing, result and serine protease enzyme activity which enterokinase operated culture supernatant of COS-1 cell were verified in COS-1 cell .

Concrete technique is stated in Working Example 5.

[0014]

From result above, as for serine protease gene which this time is isolated, on primary structure , being a novel serine protease gene , it became clear to reveal activity not only



ばかりでなく、成熟タンパク質として活性を発現することが明らかとなった。

本発明においては、新規セリンプロテアーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列として配列番号:3、4 および 5 に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明のセリンプロテアーゼの遺伝子はこれに限定されない。

一旦、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列が決定されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。

この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

【0015】

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子を得るには、実施例 3 に記載する様にして cDNA を得ることができるが、これに限定されない。

すなわち、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をコードする 1 つのヌクレオチド配列が決定されれば天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子は、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーにより cDNA としてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

【0016】

ゲノムからクローニングする場合、実施例 3 において使用した種々のプライマーヌクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノム DNA 断片の選択のためプローブとして使用することができる。

また、配列番号:3、4 または 5 に記載するヌクレオチド配列に基いて設計された他のプローブを用いることもできる。

ゲノムから目的とする DNA をクローニングするための一般的な方法は当業界においてよく知られている(Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第 5 章及び第 6 章)。

【0017】

本発明の天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子はまた、化学合成によっても調製することができる。

DNA の化学合成は当業界において自動 DNA 合成機、例えばアプライドバイオシステム社 396DNA/RNA 合成機など採用して容易である。

becoming clear, as mature protein .

Regarding to this invention, it discloses nucleotide sequence which it shows in the Sequence Number :3, 4 and 5 as nucleotide sequence of gene which code it does the novel serine protease , but gene of serine protease of this invention is not limited in this.

Once, if amino acid sequence of natural serine protease is decided, you can design various nucleotide sequence which basic coming and same amino acid sequence code is done in the degeneracy of codon , can manufacture that.

In case of this , it is desirable to use codon which is used with high frequency by host which it should use.

【0015】

To obtain gene which natural serine protease of this invention code is done, cDNA can be acquired to state in Working Example 3, but it is not limited in this.

If code is done nucleotide sequence of one which is decided amino acid sequence of namely, natural serine protease , it is possible strategy which is disclosed concretely in this invention with different strategy as cDNA , furthermore as for gene which natural serine protease code is done, cloning to do, cloning it is possible also from genome of cell which produces that to do.

【0016】

When cloning it does from genome , for selecting genomic DNA fragment you can use various primer nucleotide or probe nucleotide which is used in Working Example 3, as probe .

In addition, it is possible also to use other probe which is designed Sequence Number :3, 4 or on basis of nucleotide sequence which is stated in 5.

Putting general method in order cloning to do DNA which is made the objective from genome to this industry you have known well, (current protocols In Journal of Molecular Biology (0022 - 2836, JMOBAC ), John Wiley & Sons corporation, 5 th chapters and 6 th chapters).

【0017】

In addition as for gene which natural serine protease of this invention code is done, it can manufacture even with chemical synthesis .

chemical synthesis of DNA automated DNA synthesizer , for example Applied Biosystems corporation 396 DNA /RNA synthesis machine etc adopting in this industry , it is easy.

従って、当業者は、配列番号:3、4 および 5 に示されるヌクレオチド配列の DNA を容易に合成することができる。

【0018】

本発明の天然型セリンプロテアーゼを生来のコドンとは異なるコドンによりコードする遺伝子は、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また配列番号:3、4 または 5 に示すヌクレオチド配列を有する DNA 又は RNA を鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法(site-directed mutagenesis)等常法に従って得ることもできる(例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第 8 章を参照のこと)。

【0019】

上記のようにして本発明のセリンプロテアーゼの遺伝子が得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換えセリンプロテアーゼを製造することができる。

すなわち、本発明のセリンプロテアーゼをコードする DNA を適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物(細胞又は培地)から目的とするセリンプロテアーゼを採取する。

本発明のセリンプロテアーゼは、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N 末端アシル化、例えばホルミル化、アセチル化などの C<sub>1-6</sub> アシル化または欠失等がされた形で得られてもよい。

発現系は、シグナル配列の付加、改良や宿主の選択によって分泌効率及び発現量の向上を図ることもできる。

シグナル配列の付加及び改良手段としては、他の構造ペプチドのシグナルペプチドをコードする遺伝子を本発明のセリンプロテアーゼの構造遺伝子の 5' 側上流に、切断可能な部分ペプチドをコードする遺伝子を介するように連結する方法が挙げられる。

具体的例示としては、実施例 5 に記載したトリプシン遺伝子のシグナル配列およびエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を用いる方法があげられる。

【0020】

宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。

Therefore, person skilled in the art can synthesize DNA of nucleotide sequence which is shown in Sequence Number :3, 4 and 5 easily.

【0018】

natural serine protease of this invention codon of raw coming with different codon the gene which code is done, as though it is a description above, to be able also manufacture with chemical synthesis, In addition with mutation inducement primer following to conventional method such as site specific mutation induction method (site-directed mutagenesis) which is used Sequence Number :3, 4 or with DNA or RNA which possesses nucleotide sequence which is shown in 5 as the template, it can also obtain, (for example current protocols In Journal of Molecular Biology (0022 - 2836, JMOBAC), John Wiley & Sons corporation, Chap.8 it must be a reference).

【0019】

When gene of serine protease of this invention is acquired as description above, it rearranges making use of this, with usual genetic recombination method and can produce serine protease.

It inserts DNA which serine protease of namely, this invention code is done in suitable expression vector, said expression vector introduces into suitable host cell, culture does the said host cell, and serine protease which is made objective from culture (cell or culture medium) which is acquired it recovers.

serine protease of this invention biochemical or chemical decoration, may be acquired in form where for example N terminal acylation, for example formylation, acetylation or other C<sub>1-6</sub> acylation or deficiency etc is done.

expression system, it can do also secretion efficiency and to assure the improvement of amount of expression with addition, improvement of signal sequence and selection of host.

As addition of signal sequence and revised means, code is done the method which in order in 5's side upstream of structural genes of serine protease of the this invention, to mind gene which cuttable portion peptide code is done hitch does gene which can list signal peptide of other structure peptide.

As concrete illustration, code is done method of using the gene which can list signal sequence and enterokinase recognition sequence of trypsin (EC 3.4.21.4) gene which is stated in Working Example 5.

【0020】

prokaryotic organism or eukaryote can be used as host.

とができる。

原核生物としては細菌、特に大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス属 (*Bacillus*) 細菌、例えばバシルス・ズブチリス (*B. subtilis*) 等を用いることができる。

真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*)、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞 (*Spodoptera frugiperda*)、キャベツルーパー細胞 (*Trichoplusia ni*)、カイコ細胞 (*Bombyx mori*)、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等、具体的には、COS-1 細胞、Vero 細胞、CHO 細胞、L 細胞、ミエローマ細胞、C127 細胞、BALB/c3T3 細胞、Sp-2/O 細胞等を使用することができる。

本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

【0021】

発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス (バキュロ (昆虫)、ワクチニア (動物細胞)) 等が使用できる。

発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択され、例えば細菌用プロモーターとしては lac プロモーター、trp プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、adh1 プロモーター、pqq プロモーター等が使用される。

また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としては Simian Virus40 の early もしくは late プロモーター、CMV プロモーター、HSV-TK プロモーターまたは SR  $\alpha$  プロモーター等があげられる。

また、発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー (例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (メトトレキセート耐性)、neo 遺伝子 (G418 耐性) 等) 等を含むものを用いるのが好ましい。

なお、エンハンサーを使用する場合、例えば SV40 のエンハンサー等を遺伝子上流または下流に挿入する。

【0022】

発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、Current Protocols

bacterium, especially *E. coli* (*Escherichia coli*), *Bacillus* sp. (*Bacillus*) bacterium, for example *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) etc can be used as a prokaryotic organism.

yeast, for example *Saccharomyces* (*Saccharomyces*) being attached yeast, for example *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), or other eukaryotic microorganism, insect cell, for example [yoga] cell (*Spodoptera frugiperda*), cabbage looper cell (*Trichoplusia ni*), *Bombyx mori* (silkworm) cell (*Bombyx mori*), animal cell, for example human cell, monkey cell, mouse cell etc, concretely, COS-1 cell, Verocell, CHO cell, L cell, myeloma cell, C127 cell, BALB/c3T3 cell, Sp-2/O cell etc can be used as eukaryote.

Regarding to this invention, furthermore, that itself, for example insect, for example *Bombyx mori* of bioorganism (silkworm), it is possible also to use cabbage looper etc.

【0021】

[bakyuro] (insect) You can use vaccinia (animal cell) etc. As expression vector, plasmid, phage, phagemid, virus

promoter in expression vector is selected depending on host cell, lac promoter, trp promoter etc is used as promoter for for example bacterium, for example adh1 promoter, pqq promoter etc is used as the promoter for yeast.

In addition, you can list early or late promoter, CMV promoter, HSV-TK promoter or SR  $\alpha$  promoter etc of Simian Virus40, as animal cell such as baculovirus polyhedrin promoter as promoter for insect.

In addition, it is desirable in expression vector to use fact that the enhancer, splicing signal, poly A addition signal, selectable marker (for example dihydrofolate reductase gene (methotrexate resistance), neogene (G418 resistance) etc) etc is contained to other than above.

Furthermore, when enhancer is used, enhancer etc of for example SV40 is inserted in upstream or downstream of gene.

【0022】

As for transformation of host, it is possible with expression vector to do by conventional method which is informed well putting to this industry these method are stated for example

in Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、に記載されている。

形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。

培養物からのセリンプロテアーゼの精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

【0023】

このようにして得られる本発明のセリンプロテアーゼは、機能的タンパク質であることから、本酵素を用いる本酵素特異的阻害物質のスクリーニングを可能とし、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索研究に有用である。

スクリーニング方法の具体例として、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物のような、または、各種細胞培養上清等より得られる天然成分、各種合成化合物等の人工成分のような被験試料の本酵素阻害活性を、実施例 2 と同様にして、酵素活性の測定を行なうことにより行うことができる。

また、本発明のセリンプロテアーゼの部分ペプチドまたは前記した本酵素の遺伝子もしくはその部分ペプチドをコードする DNA で形質転換された宿主もしくはその細胞膜画分を使用する上記酵素活性測定、結合親和性測定等も本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様である。

【0024】

すなわち、本発明のセリンプロテアーゼは、その部分ペプチドとして本発明のスクリーニング方法に用いることができる。

また、本発明のスクリーニング方法においては、本発明のセリンプロテアーゼをコードする遺伝子またはその部分ペプチドをコードする DNA を含んで成る組換えベクターにより形質転換され、本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを発現する宿主細胞またはその細胞膜画分を使用してもよい。

【0025】

この場合の部分ペプチドとしては、活性部位のセリン残基の近傍に存在するペプチド断片および例えば実施例 3(6)に用いたような本発明のセリンプロテアーゼに特異的な抗体の認識部位となり得るペプチド断片などの本発明のセリン

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons corporation.

Following also culture of transformed host to conventional method, it is possible to do.

Can refine serine protease from culture, following protein to conventional method in order isolation and purification to do, to do with chromatography etc which uses the for example ultrafiltration, various column chromatography, for example Sepharose.

【0023】

serine protease of this invention which is acquired this way from fact that it is a functional protein, makes screening of this enzyme specific inhibitor which uses this enzyme possible, this said screening method is useful in exploratory research of various disease treatment agent.

As embodiment of screening method, it seems like for example peptide, protein, nonpeptidic compound, synthesized compound, fermentation product, it is possible to do by measuring enzyme activity or, from various cell culture supernatant etc main enzyme inhibiting activity of the test sample like natural component, various synthesized compound or other artificial component which are acquired, to similar to Working Example 2.

In addition, portion peptide or before of serine protease of this invention it is a embodiment where host which transformation is done or above-mentioned enzyme activity measurement, binding affinity measurement etc which uses plasma membrane fraction screening method of this invention is desirable with DNA which gene or portion peptide of this enzyme which was inscribed code is done.

【0024】

You can use serine protease of namely, this invention, for screening method of this invention as the portion peptide.

In addition, regarding to screening method of this invention, gene which the code it does serine protease of this invention or including DNA which the code it does, portion peptide transformation it is done by recombinant vector which becomes, host cell which reveals serine protease or portion peptide of this invention or it is possible to use plasma membrane fraction.

【0025】

As portion peptide in this case, peptide fragment which consists of region which is peculiar to serine protease of peptide fragment or other this invention which can become recognition site of specific antibody in serine protease of kind of this invention which is used for the peptide fragment and

ロテアーゼに特有の領域からなるペプチド断片を挙げることができる。

なお、該部分ペプチドの作成は、本発明のセリンプロテアーゼについて前記した方法またはそれ自体公知のペプチドの合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼの切断により行なうことができる。

【0026】

また、上記の細胞膜画分は、本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞を、発現が可能な条件下培養し、得られたセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを含有する宿主細胞をそれ自体公知の方法で破碎した後、得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。

【0027】

本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを用いる阻害物質のスクリーニング方法は、本発明のセリンプロテアーゼもしくはその部分ペプチドまたは該セリンプロテアーゼもしくはその部分ペプチドを含有する宿主細胞もしくはその細胞膜画分を用いて、被検試料をスクリーニングすることにより行なわれる。

具体的方法として、本発明のセリンプロテアーゼおよびその部分ペプチドの基質、例えば、発色基質等の合成基質、放射性核種により標識された基質等、を用いる酵素活性測定法や結合親和性測定法により行なわれる。

なお、セリンプロテアーゼを含有する宿主細胞を用いる場合、それ自体公知の方法で細胞を固定化(グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド等で)して用いることができる。

【0028】

【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

実施例 1. ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞の培養と培養上清の調製

ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞 (ATCC CCL-224) を 80cm<sup>2</sup> の培養面積を持つ T フラスコ(Nunc)で培養した。

すなわち、T フラスコあたり  $2 \times 10^6$  細胞を植え、10%ウシ胎児血清 (FBS, GIBCO BRL 社) を含

for example Working Example 3 (6) which exist in vicinity of serine residue of the active site can be listed.

Furthermore, as for compilation of said portion peptide, before method which was inscribed or it is possible with synthetic method or suitable protease of the peptide of that itself public knowledge concerning serine protease of this invention to do with the cutting of said serine protease.

【0026】

In addition, above-mentioned plasma membrane fraction culture under condition whose revelation is possible does host cell which can reveal DNA which serine protease or portion peptide of this invention code is done, serine protease which is acquired or host cell which contains portion peptide fragmenting after doing, means thing of fraction where plasma membrane which is acquired is mainly included with that itself known method.

【0027】

screening method of inhibitor which uses serine protease or portion peptide of this invention is done by doing sample making use of host cell or plasma membrane fraction which contain serine protease or portion peptide or said serine protease or portion peptide of this invention, screening.

It is done as concrete method, serine protease of this invention and with substrate, for example chromophoric substrate or other synthetic substrate, radioactivity nuclear specie of its portion peptide substrate etc which labelling, by the enzyme activity measurement method and binding affinity measurement method which are used.

Furthermore, when host cell which contains serine protease is used, fixing (With glutaraldehyde, formaldehyde etc) cell you can use with that itself known method.

【0028】

[Working Example(s)]

this invention is explained below, on basis of Working Example.

culture of COLO 201 cell of Working Example 1. human colon cancer derivation and manufacturing of culture supernatant

COLO 201 cell (ATCC CCL-224) of human colon cancer derivation culture was done with T flask (Nunc) which has culture surface area of 80 cm<sup>2</sup>.

Until per namely, T flask it plants  $2 \times 10^6$  cell, it becomes confluent making use of RPMI -1640 culture

む RPMI-1640 培地(日水製薬)を用いて、コンフルエントになるまで培養した。

次に、 $10^{-8}$ M 亜セレン酸ナトリウム(Sigma)含有タンパク質無添加 RPMI-1640 培地に交換した。

2 週間培養後、培養上清を回収し、 $0.22\mu\text{m}$  の滅菌フィルター(Millipore)で濾過滅菌した後、培養上清中の酵素活性を測定する材料に供した。

【0029】

実施例 2. ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞の培養上清中の酵素活性の測定

実施例 1 で得られた培養上清中のセリンプロテアーゼ酵素活性は、テストチーム発色基質 S-2251(H-D-バリル-L-ロイシル-L-リジル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩、第一化学薬品)を用いて測定した。

すなわち、精製水で  $1\text{ mg/ml}$  に溶解したテストチーム発色基質 S-2251  $50\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{ M}$  Tris/HCl (pH7.5)  $40\mu\text{l}$  および COLO 201 細胞の培養上清  $10\mu\text{l}$  を加え、室温で 60 分放置後、 $405\text{nm}$  における吸光度を測定した。

【0030】

培養上清の代わりに培地を  $10\mu\text{l}$  加えた時の吸光度をブランクとした場合、COLO 201 細胞の培養上清の吸光度は、 $0.42$  であった。

また、別の基質 H-D-バリル-L-ロイシル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩(第一化学薬品)を用いても同程度の活性を示した。

また、本測定系における各種プロテアーゼ阻害剤の効果をみた結果、COLO 201 細胞の培養上清中には明らかにセリンプロテアーゼ酵素活性があることが確認された(表 1)。

【0031】

【表 1】

medium (Nissui Pharmaceutical Co.) which includes 10% fetal calf serum (FBS, GIBCO BRL corporation), culture it did.

Next, you exchanged to  $10^{-8}$ M sodium selenite (Sigma) content protein no addition RPMI -1640 culture medium .

2 weeks culture later, culture supernatant it recovered, filter sterilization after doing, it offered to material which measures enzyme activity in culture supernatant with the sterilization filter (Millipore) of  $0.22\mu\text{m}$  .

[0029]

Measurement of enzyme activity in culture supernatant of COLO 201 cell of Working Example 2 . human colon cancer derivation

It measured serine protease enzyme activity in culture supernatant which is acquired with Working Example 1, making use of test team chromophoric substrate S-2251 (H-D-valyl -L- leucyl -L- jp9 Jill -p- nitro anilide \*dihydrochloride , Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd. (DB 69-059-3439) ).

test team chromophoric substrate S-2251  $50\mu\text{l}$  ,  $0.1\text{ M}$  Tris/HCl which is melted in  $1\text{ mg/ml}$  with namely, purified water (pH 7.5 )including  $40\mu\text{l}$  and culture supernatant  $10\mu\text{l}$  of COLO 201 cell , with the room temperature after 60 minutes leaving, absorbance in  $405\text{ nm}$  was measured.

[0030]

When  $10\mu\text{l}$  adding culture medium in place of culture supernatant , when the absorbance is designated as blank , absorbance of culture supernatant of COLO 201 cell was  $0.42$ .

In addition, activity of same extent was shown making use of another substrate H-D- valyl -L- leucyl -L-arginyl p- nitro anilide \*dihydrochloride ( Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd. (DB 69-059-3439) ).

In addition, it was verified in culture supernatant of result and COLO 201 cell which looked at effect of various protease inhibitor in this measuring system (Table 1 ) that it is serine protease enzyme activity clearly.

[0031]

[Table 1]

JP1997149790A

阻害剤* 又は処理		残存活性 (%)
アプロチニン	250 KIU/ml	0.4%
ロイペプチン	0.1 mM	0.7%
ベンズアミジン	1 mM	0.7%
pABSF <sup>1)</sup>	1 mM	1.4%
NEM <sup>2)</sup>	1 mM	100.0%
EDTA <sup>3)</sup>	1 mM	74.0%
トリトン	2.5%	61.1%
	0.25%	100.0%
SDS <sup>4)</sup>	0.2%	0.0%
加熱	95℃、10分間	27.0%

\*ブレインキューベーション37℃、10分間

- 1) pABSF: 4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホン  
フルオリド・HCl (和光純薬)
- 2) NEM: N-エチルマレイミド (Sigma)
- 3) EDTA: エチレンジアミン四酢酸 (Sigma)
- 4) SDS: ドデシル硫酸ナトリウム (Sigma)

## 【0032】

実施例 3. 新規セリンプロテアーゼ遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定

(1) COLO 201 細胞 mRNA の単離精製

COLO 201 細胞 mRNA の調製は、アイソジェン(日本ジーン)を用いて添付の文書に従って行った。

すなわち、COLO 201 細胞を T フラスコ(Nunc, 80cm<sup>2</sup>) でコンフルエントになるまで増殖させた後、T フラスコあたり 1 ml のアイソジェンを加えることにより細胞を溶解した。

さらに、クロロホルム 200  $\mu$ l を加えて攪拌し、15,000 rpm, 4 deg C で 15 分間遠心した。

## 【0033】

遠心後、水相を回収し、回収した水相に 500  $\mu$ l のイソプロパノールを加えて攪拌し、15,000 rpm, 4 deg C で 30 分間遠心した。

## 【0032】

cloning of Working Example 3. novel serine protease gene and identification of protein

isolation and purification of (1) COLO 201cell mRNA

It manufactured COLO 201cell mRNA, following to document of attachment, making use of Isogen (Nippon Gene).

Until namely, COLO 201cell with Tflask (Nunc, 80cm<sup>2</sup>) it becomes confluent, after multiplying, cell was melted per Tflask by adding Isogen of 1 ml.

Furthermore, it agitated including chloroform 200  $\mu$ l, 15 min centrifugation did with 15,000 rpm, 4 deg C.

## 【0033】

After centrifugation, aqueous phase it recovered, it agitated in aqueous phase which recovers including isopropanol of 500  $\mu$ l, 30 min centrifugation did with 15,000 rpm, 4 deg C.

得られた全 RNA の沈殿を 400  $\mu$ l のジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理した蒸留水に溶解し、400  $\mu$ l の 2 $\times$  溶出緩衝液 (20mM Tris-HCl pH7.5, 2mM EDTA, 0.2% SDS)を加え混合した。

さらに、500  $\mu$ l の Oligotex-dT30(日本ロッシュ)懸濁液を加えて混合し、65 deg C で 5 分間加熱した。

氷中で急冷後、130  $\mu$ l の 5M NaCl を加えて 37 deg C で 10 分間加熱した。

【0034】

加熱後、15,000 rpm, 4 deg C で 3 分間遠心し、上清を取り除いた後、沈殿を 500  $\mu$ l の洗浄緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1M NaCl) に懸濁し、さらに、15,000 rpm, 4 deg C で 3 分間遠心した。

上清を取り除いた後、沈殿を 400  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水に懸濁した。

65 deg C で 5 分間加熱した後、15,000 rpm, 4 deg C で 3 分間遠心し、上清を回収した。

【0035】

この上清に 20  $\mu$ l の 5M NaCl 、1 ml のエタノールを加え、攪拌後、15,000 rpm, 4 deg C で 20 分間遠心した。

沈殿物を 500  $\mu$ l の 70 %エタノールで洗い、軽く風乾後、10  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

この結果、T フラスコ 16 本から約 12  $\mu$ g の polyA<sup>+</sup> RNA を得た。

(2)cDNA ライブラリーの調製

cDNA ライブラリーの調製は、スーパー・スクリプト・プラスミド・システム(Super Script Plasmid System)(Life Technologies)を用いて行った。

【0036】

工程 1. cDNA の合成

COLO 201 細胞 mRNA 5  $\mu$ l( 約 6  $\mu$ g)にオリゴ dT Not I プライマー 2  $\mu$ l (1  $\mu$ g)を加え、70 deg C で 10 分間熱した後、氷中で急冷した。

この熱変性 mRNA に、4  $\mu$ l の 5 $\times$ First strand buffer (250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) , 1  $\mu$ l の 10mM dNTP, 2  $\mu$ l の 0.1M DTT, DEPC 処理した蒸留水および 5  $\mu$ l (1000U)の Super Script II RT を加え、37 deg C

C.

Precipitation of whole RNA which it acquires diethyl pyrocarbonate (DEPC) of 400;  $\mu$ l it melted in distilled water which was treated, it mixed including 2 X ligation buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM EDTA, 0.2% SDS ) of 400;  $\mu$ l .

Furthermore, it mixed including Oligotex-dT30 (Nippon Roche) suspension of 500;  $\mu$ l , 5 min heated with 65 deg C.

In ice 10 min it heated with 37 deg C after quench ,including 5 M NaCl of 130;  $\mu$ l .

【0034】

After heating, 3 min centrifugation it did with 15,000 rpm , 4 deg C, after removing the supernatant , it precipitated, in washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1 % SDS, 0.1 M NaCl ) of 500;  $\mu$ l suspension furthermore, 3 min centrifugation did with 15,000 rpm , 4 deg C.

After removing supernatant , it precipitated DEPC of 400;  $\mu$ l in distilled water which was treated suspension.

5 min after heating with 65 deg C, 3 min centrifugation it did with 15,000 rpm , 4 deg C, supernatant recovered.

【0035】

20 min centrifugation it made this supernatant with after stirring , 15, 000 rpm , 4 deg C including ethanol of 5 M NaCl , 1 ml of 20;  $\mu$ l .

You washed precipitate with 70% ethanol of 500;  $\mu$ l , you melted in the distilled water which after air dry , DEPC of 10;  $\mu$ l was treated lightly.

this result, polyA<sup>+</sup> RNA of approximately 12;  $\mu$ g was acquired from T flask 16 book.

Manufacturing (2) cDNA library

It manufactured cDNA library , making use of super \*script \*plasmid \*system (Super Script Plasmid system ) (Life Technologies, Inc. ).

【0036】

Synthesis of step 1. cDNA

After 10 min heating to COLO 201 cell mRNA 5 ;  $\mu$ l ( Approximately 6;  $\mu$ g ) with 70 deg C including oligo dT Not I primer 2;  $\mu$ l (1;  $\mu$ g ), quench it did in ice .

In this heat-modified mRNA , 1 hour it reacted with 37 deg C 5 X First strand buffer of 4;  $\mu$ l (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub> ), 0.1 MDT T, DEPC of 10 mM dNTP , 2 ;  $\mu$ l of 1;  $\mu$ l including Super Script II RT of distilled water and 5;  $\mu$ l (1000 U ) which



で 1 時間反応させた。

【0037】

次に、この反応液に 91  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水、30  $\mu$ l の 5 × Second strand buffer (100mM Tris-HCl pH6.9, 450mM KCl, 23mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM  $\beta$  - NAD<sup>+</sup>, 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 3  $\mu$ l の 10mM dNTP, 1  $\mu$ l (10U) の E.Coli DNA リガーゼ、4  $\mu$ l (40U) の E.Coli DNA polimerase および 1  $\mu$ l (2U) の E.Coli RNase H を加え、16 deg C で 2 時間反応後、2  $\mu$ l (10U) の T4 DNA ポリメラーゼを加え 16 deg C で 5 分間反応させた。

【0038】

さらに、この溶液に 10  $\mu$ l の 0.5M EDTA を加えて混合した後、150  $\mu$ l のフェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール(25:24:1) を加え、攪拌後 15,000rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。

得られた上清に、10  $\mu$ l の 5M KOAc, 400  $\mu$ l のエタノールを加え攪拌し、15,000 rpm で 10 分間遠心した。

遠心して得られた沈殿物を 500  $\mu$ l の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、25  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

【0039】

工程 2. Sal I アダプターの付加

工程 1 で得られた 2 本鎖 cDNA 25  $\mu$ l に 10  $\mu$ l の 5 × T4 DNA リガーゼ緩衝液 (250mM Tris-HCl pH7.6, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ATP, 5mM DTT, 25% (w/v), PEG 8000), Sal I アダプター溶液 10  $\mu$ l (10  $\mu$ g) および 5  $\mu$ l (5U) の T4 DNA リガーゼを加え、16 deg C にて 16 時間反応後、50  $\mu$ l のフェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール(25:24:1) を加え、攪拌後 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。

回収した上清に、5  $\mu$ l の 5M KOAc, 125  $\mu$ l のエタノールを加え攪拌し、-80 deg C, 20 分間冷却後、15,000 rpm で 10 分間遠心した。

遠心して得られた沈殿物を 200  $\mu$ l の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、40  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水に溶解した。

【0040】

工程 3. 制限酵素 Not I による切断

工程 2 の反応液 20  $\mu$ l に Not I 4  $\mu$ l (60U) を加え、37 deg C で 3 時間反応後、フェノール: ク

were treated.

【0037】

With 16 deg C 5 min it reacted with 16 deg C 2 hours reactions later, including T4 DNA polymerase of 2;  $\mu$ l (10 U ) next, DEPC of 91;  $\mu$ l 5 X second strand buffer of distilled water , 30;  $\mu$ l which was treated (100 mM Tris-HCl pH 6.9, 450mM KCl, 23mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ), including E.coli DNA polimerase of E.coli DNA ligase , 4;  $\mu$ l (40 U ) of 10 mM dNTP , 1;  $\mu$ l (10 U ) of 3;  $\mu$ l and E.coli RNase H of 1;  $\mu$ l (2 U ) in this reaction mixture .

【0038】

Furthermore, to this solution 5 min centrifugation it did with after stirring 15, 000rpm after mixing including 0.5 MED TA of 10;  $\mu$ l , including phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24: 1) of 150;  $\mu$ l , supernatant recovered.

To supernatant which it acquires, it agitated including ethanol of 5 M KOAc, 400;  $\mu$ l of 10;  $\mu$ l , 10 min centrifugation did with 15,000 rpm .

centrifugation doing, you washed precipitate which it acquires with 70% ethanol of 500;  $\mu$ l , you melted in distilled water which after air dry , the DEPC of 25;  $\mu$ l was treated lightly.

【0039】

Addition of step 2. Sal I adapter

With 16 deg C 5 min centrifugation it did with after stirring 15, 000 rpm 16 hour reactions later, including phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24: 1) of 50;  $\mu$ l , in double strand cDNA 25 ;  $\mu$ l which is acquired with step 1 5 X T4 DNA ligase buffer of 10;  $\mu$ l (250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ATP , 5mM DTT , 25% (w/v ) , PEG 8000 ), Sal I adapter solution 10;  $\mu$ l (10;  $\mu$ g ) and including T4 DNA ligase of 5;  $\mu$ l (5 U ), supernatant recovered.

To supernatant which recovers, it agitated including ethanol of 5 M KOAc, 125;  $\mu$ l of 5;  $\mu$ l , - 80 deg C, 20min cooling later, 10 min centrifugation did with 15,000 rpm .

centrifugation doing, you washed precipitate which it acquires with 70% ethanol of 200;  $\mu$ l , you melted in distilled water which after air dry , the DEPC of 40;  $\mu$ l was treated lightly.

【0040】

It cuts off with step 3. restriction enzyme Not I

In reaction mixture 20;  $\mu$ l of step 2 3 hours reactions later, it did phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24: 1)

クロホルム: イソアミルアルコール(25:24:1) 抽出を行い、上清を回収した。

この上清をクロマスピン-1000 カラム(クオンテック)で 1 キロ塩基対以上のサイズを分画し 50  $\mu$ l の溶出液を得た。

【0041】

工程 4. pSPORT ベクターとのライゲーション

サイズ分画した cDNA 溶液 3  $\mu$ l に Sal I および Not I で消化した pSPORT ベクター 1  $\mu$ l (50ng;Life Technologies)を加え、さらに 11  $\mu$ l の DEPC 処理した蒸留水、4  $\mu$ l の 5  $\times$  T4 DNA リガーゼ緩衝液および 1  $\mu$ l の 5  $\times$  T4 DNA リガーゼを加え、室温で 3 時間反応させた。

【0042】

反応後、フェノール: クロホルム: イソアミルアルコール(25:24:1) 抽出を行い、5  $\mu$ l (5  $\mu$ g) の酵母 tRNA、5  $\mu$ l の 5M KOAc および 125  $\mu$ l のエタノールを加えて攪拌し、-80 deg C で 20 分間冷却後、15,000 rpm で 10 分間遠心した。

遠心して得られた沈殿物を 200  $\mu$ l の 70% エタノールで洗い、軽く風乾後、5  $\mu$ l の TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)に溶解した。

【0043】

工程 5. 大腸菌 DH10B への形質転換

工程 4 で得られたライゲーション後 cDNA を大腸菌 Electro MAX DH10B(F', mcrA,  $\phi$  80dlacZ  $\Delta$  M15,  $\Delta$  (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\Delta$  lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139,  $\Delta$  (ara, leu)7697, galU, galK,  $\lambda$  -, rpsL, nupG;Life Technologies)にエレクトロポレーション法により形質転換した。

すなわち、50  $\mu$ l の DH10B 細胞に 2  $\mu$ l のライゲーション後 cDNA を加え、終容量 26  $\mu$ l  $\times$  2 本として、エレクトロポレーター(Bio-Rad)で 400V, 330  $\mu$ F の条件で実施した。

【0044】

次に、4 ml の SOC 培地 (2%バクト・トリプトン, 0.5%バクト・酵母エキス, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM グルコース) で大腸菌を回収し、37 deg C で 1 時間振とう培養後、50 mg/ml のアンピシリンを含む LB プレート (1%バクト・トリプトン, 0.5%バクト・酵母エキス, 0.5% NaCl, 0.1% グルコース, 1.5%

extraction with 37 deg C including Not I 4 ;mu l (60 U ), the supernatant recovered.

this supernatant size of 1 kilobase-pair or more fraction was done with the chroma spin -1000 column (Clontech Laboratories, Inc. ) and eluate of 50;mu l was acquired.

【0041】

ligation of step 4. pSPORTvector

3 hours it reacted with room temperature including 5 X T4 DNA ligase buffer of distilled water , 4 ;mu l which was treated and 5 X T4 DNA ligase of 1;mu l with Sal I and Not I in cDNA solution 3;mu l which size fraction is done including the pSPORTvector 1 ;mu l (50 ng ;Life Technologies, Inc. ) which digestion is done, furthermore DEPC of 1;mu l .

【0042】

After reacting, it did phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24: 1) extraction, it agitated including 5 M KOAc of yeast tRNA , 5;mu l of 5;mu l (5;mu g ), and ethanol of 125;mu l - with 80 deg C 20 min cooling later, 10 min centrifugation did with 15,000 rpm .

centrifugation doing, you washed precipitate which it acquires with 70% ethanol of 200;mu l , after air dry , melted in TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA ) of 5;mu l lightly.

【0043】

transformation to step 5. E. coli DH10B

cDNA after ligation which is acquired with step 4 transformation was done in E. coli Electro MAX DH10B (F', mcrA , ;ph 80 dlacZ:de M15, :de (mrr-hsdRMS-mcrBC ), :de lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, :de (ara, leu ) 7697, galU, galK, ;la -,rpsL, nupG;Life Technologies, Inc. ) with electroporation method .

In DH10B cell of namely, 50;mu l with electroporator (Bio-Rad ) it executed with the condition of 400 V, 330 ;mu F cDNA after ligation of 2;mu l including, as end volume 26;mu l  $\times$  2 .

【0044】

Next, with SOC culture medium (2% Bacto \*triptone , 0.5%Bacto \*yeast extract , 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM glucose ) of 4 ml E. coli it recovered, 1 hour concussion culture later, it sowed on LBplate (1% Bacto \*triptone , 0.5%Bacto \*yeast extract , 0.5% NaCl, 0.1 % glucose , 1.5%Bacto \*agar ) which includes the ampicillin of 50 mg/ml

バクト・アガー) にまいて 37 deg C で一夜培養した。

その結果、約  $1.1 \times 10^6$  個のクローンを含む cDNA ライブラリーが得られた。

#### 【0045】

(3)セリンプロテアーゼ保存領域を用いた PCR

活性残基 (His)近傍のアミノ酸保存領域を基に配列番号:1 に示すオリゴマー-KY185 を合成した。

また、活性残基 (Ser)近傍のアミノ酸保存領域を基に配列番号:2 に示すオリゴマー-KY189 を合成した。

実施例 3(2)工程 3.で得られた cDNA をテンプレート、オリゴマー-KY185 - KY189 をプライマーとして、Ampli-Taqポリメラーゼ (パーキンエルマー社) にて PCR を行った。

この PCR 反応液を pCR II ベクター(インビトロジェン)にサブクローニングし、431 塩基対の DNA 断片を持つクローンを得た。

これらクローンのシーケンスを行った結果、2つの活性残基 (His, Ser) の間にあるセリンプロテアーゼに保存されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことが確認された。

#### 【0046】

(4)セリンプロテアーゼのスクリーニング

前記実施例 3.(3)で得られたプラスミドをテンプレートとした PCR により、蛍光標識プローブを作成した。

このプローブを用い、実施例 3(2)工程 5.で得られた約 110 万クローンの cDNA ライブラリーを常法によりスクリーニングした。

その結果、約 20 万個から 6 個の陽性クローンを得た。

挿入 DNA 断片の大きさを調べ、最長のクローン pSPORT / SP59-#3 (約 1.4 キロ塩基対) を選び、本遺伝子のシーケンスを Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)で決定した。

#### 【0047】

(5)塩基配列の特徴

pSPORT / SP59-#3 の cDNA の塩基配列を配列番号:3 に示す。

その結果、pSPORT/ SP59-#3 の cDNA の全長は 1,438 塩基対で、155 塩基対の 5'非翻訳領

with 37 deg C and overnight culture did with 37 deg C.

As a result, cDNA library to which approximately  $1.1 \times 10^6$  includes the clone acquired.

#### [0045]

PCR which uses (3) serine protease storage area

oligomer KY185 which on basis of amino acid storage area of activity residue (His ) vicinity is shown in Sequence Number :1 was synthesized.

In addition, oligomer KY189 which on basis of amino acid storage area of activity residue (Ser ) vicinity is shown in Sequence Number :2 was synthesized.

PCR was done with Ampli-Taq polymerase (Perkin Elmer ) cDNA which is acquired with Working Example 3 (2) step 3. with template , oligomer KY185 - KY189 as primer .

this PCR reaction liquid subcloning was done in pCR II vector (Invitrogen ), clone which has the DNA fragment of 431 base pair was acquired.

As for result of doing sequence of these clone , code is done it was verified amino acid sequence which is retained in serine protease which is between 2 activity residue (His , Ser ) that nucleotide sequence which is included.

#### [0046]

screening of (4) serine protease

fluorescently labeled probe was drawn up with PCR which designates plasmid which is acquired with aforementioned Working Example 3. (3) as template .

Making use of this probe , cDNA library of approximately 1,100,000 clone which are acquired with Working Example 3 (2) step 5. screening was done with the conventional method .

As a result, positive clone of 6 was acquired from approximately 200,000.

size of inserted DNA fragment was inspected, clone pSPORT / SP59-#3 (Approximately 1.4 kilobase-pair ) of longest was chosen, sequence of this gene was decided with Taq dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems ).

#### [0047]

Feature of (5) nucleotide sequence

nucleotide sequence of cDNA of pSPORT / SP59-#3 is shown in Sequence Number :3.

As a result, total length of cDNA of pSPORT/ SP59-#3 with 1,438 base pair , consists of 3' untranslated region of

域、732塩基対の翻訳領域、551塩基対の3'非翻訳領域から成る。

翻訳領域はアミノ酸244残基をコードしていることが明らかとなった。

【0048】

(6)SP59タンパク質のペプチドフラグメントに対する抗体の作製

SP59のアミノ酸配列のうち、配列番号:6の部分ペプチド(配列番号:3のアミノ酸番号56~67にCysを付加したもの)、配列番号:7の部分ペプチド(配列番号:3のアミノ酸番号96~110番)および配列番号:8の部分ペプチド(配列番号:3のアミノ酸番号210~223番)を合成して、純度90%以上の各部分ペプチドを得た。

【0049】

各ペプチドフラグメントは、N-(m-マレイミドベンゾイルオキシ)スクシンイミド(MBS、ナカライテスク)で活性化したウシ血清アルブミン(BSA、ナカライテスク)に結合させて免疫した。

すなわち、5mgのBSAを50mMリン酸緩衝液(pH8.0)に溶解した後、DMSOに溶解したMBSを1.25mg加え、室温で30分間攪拌し、MBS活性化BSAを得た。

次に、MBS活性化BSAに50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した各ペプチドフラグメント5mgを加え、室温で3時間攪拌することによりカップリングした。

カップリングした各ペプチドフラグメントを Freund 完全アジュバント(ナカライテスク)と混和し、常法により抗血清を作製した。

【0050】

(7)ヒト膵臓癌由来の HPC-Y3 細胞培養上清からの SP59 タンパク質の精製

実施例1と同様にして得られた HPC-Y3 細胞培養上清の凍結乾燥品10mgを0.1MNaClを含む10mMTris/HCl、pH7.4に1mg/ml によりように溶解し、4ml/分の流速で Superose6(ファルマシア)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。

各フラクションを(6)で得た SP59 部分ペプチド抗体を用いたウエスタンブロットおよび合成基質(Boc-Phe-Ser-Arg-4-メチル-クマリル-7-アミド(以下、MCA)、Boc-Gln-Ala-Arg-MCA)を用いた酵

transcription region, 551 base pair of 5' untranscribed region, 732 base pair of 155 base pair.

As for transcription region code it became clear to have done amino acid 244 residue.

【0048】

Production of antibody for peptide fragment of (6) SP59 protein

Among amino acid sequence of SP59, portion peptide of Sequence Number :6 (Those which add Cys to amino acid number 56~67 of Sequence Number :3.), portion peptide of Sequence Number :7 (amino acid number 96~110 turn of Sequence Number :3) and synthesizing portion peptide (amino acid number 210~223 turn of Sequence Number :3) of Sequence Number :8, it acquired each portion peptide of purity 90% or more.

【0049】

Connecting to bovine blood serum albumin (BSA, Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079)) which is activated with N-(m-maleimide benzoyl oxy) succinimide (MBS, Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079)), immunity it did each peptide fragment.

After melting BSA of namely, 5mg in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0), 1.25 mg it added MBS which is melted in DMSO, 30 min agitated with room temperature, acquired MBS activated BSA.

Next, coupling it did by agitating with room temperature including each peptide fragment 5mg which is melted in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) in MBS activated BSA, 3 hours.

Each peptide fragment which coupling is done Freund complete adjuvant (Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079)) with it mixed, it produced antiserum with conventional method.

【0050】

Refining SP59 protein from HPC-Y3 cell culture supernatant of (7) human pancreatic cancer derivation

In 10 mM Tris HCl, pH 7.4 which include 0.1 M NaCl with 1 mg/ml way it melted the lyophilized product 10mg of HPC-Y3 cell culture supernatant which it acquires in same way as Working Example 1 it offered to gel filtration chromatography which uses Superose6 (Pharmacia) with flow rate of 4 ml per minute.

Measurement of enzyme activity which uses Western blot and synthetic substrate (Boc-Phe-Ser-Arg-4-methyl-coumaril-7-amide (Below, MCA), Boc-Gln-Ala-Arg-MCA) which use SP59 portion peptide antibody which acquires each

素活性の測定を実施した。

その結果、フラクション 63-70 に溶出した画分に活性を認め、同画分を MonoQ カラム(ファルマシア)によるイオン交換クロマトグラフィーにそのままアブライした。

【0051】

次に、MonoQ カラム非結合画分をそのまま 10mM リン酸緩衝液、pH6.8 であらかじめ平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(ペンタックス)にアブライしたのち、リン酸緩衝液のリニアグラジエントで溶出させたところ、活性画分は、150 mM 濃度のリン酸緩衝液で溶出した。

ついで、20mM リン酸緩衝液、pH6.8 であらかじめ平衡化した MonoS カラムにアブライし、0.1 MNaCl 濃度でシングルピークとして活性画分が溶出した。

溶出画分を C4 カラムで脱塩したのち、N 末端アミノ酸分析に供した。

【0052】

(8)N 末端アミノ酸配列の分析

SP59 タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析を、以下の通り行った。

すなわち、HPC-Y3 細胞無タンパク質培養上清から、前述した方法で精製した SP59 タンパク質を用いて、SDS -ポリアクリルアミド電気泳動を行なった。

電気泳動後、Matsudaira(Matsudaira, P.(1987)J.Biol.Chem.262, 10035-10038)の方法に従って PVDF 膜に転写した。

さらに、Speicher(Speicher, D.W.(1989)"Techniques in Protein Chemistry"(Hugli, T.E.ed.), pp.24-35.Academic Press, San Diego) の方法に従ってクーマシーブルー染色することにより SP59 タンパク質を検出した。

この SP59 タンパク質染色画分を切り取り、十分に洗浄、風乾後、N 末端アミノ酸配列分析の試料とした。

分析には、アブライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) の 477 A 気相シーケンサーを用いた。

【0053】

フェニルチオヒダントイン誘導体は、アブライド・バイオシステムズの 120A オンラインシステムの

fraction with (6) was executed.

As a result, activity was recognized in fraction which is liquated in fraction 63-70, same fraction with MonoQ column (Pharmacia) applying was designated that way as ion exchange chromatography.

【0051】

Next, in hydroxyapatite column (Pentax) which equilibration does MonoQ column non-connection fraction that way beforehand with 10 mM phosphate buffer, pH 6.8 applying after doing, when it liquates with linear gradient of phosphate buffer, it liquated active fraction, with the phosphate buffer of 150 mM concentration.

Next, applying it did in MonoS column which equilibration is done beforehand with 20 mM phosphate buffer, pH 6.8, active fraction liquated with 0.1 MNaCl concentration as single peak.

elution fraction desalting after doing, was offered to N-terminal amino acid analysis with C4 column.

【0052】

Analysis of (8) N-terminal amino acid sequence

You analyzed SP59 protein N-terminal amino acid sequence, as follows.

SDS -polyacrylamide electrophoresis was done from namely, HPC - Y3 cell non protein culture supernatant, making use of SP59 protein which was refined with method which is mentioned earlier.

After electrophoresis, following to method of Matsudaira (Matsudaira, P. (1987) Journal of Biological Chemistry (0021 - 9258, JBCHA3 ). 262, 10035 - 10038), it copied to PVDF membrane.

Furthermore, following to method of Speicher (Speicher, D.W. (1989) "techniques in protein Chemistry" (Hugli, T.E.ed.), pp.24-35.Academic Press, San Diego), it detected the SP59 protein Coomassie blue by dyeing.

It cut off this SP59 protein dyeing fraction, after washing and air dry, made specimen of N-terminal amino acid sequence analysis in fully.

477 Agas phase sequencer of Applied Biosystems (Applied Biosystems) were used to analysis.

【0053】

identification it did phenylthio hydantoin derivative, with reverse-phase HPLC (Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W.,

逆相 HPLC(Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., & Dreyer, W.J.(1981) J.Biol.Chem.256, 7990-7997)によって同定した。

その結果、SP59 タンパク質の成熟型 N 末端アミノ酸配列は、推定された通り、アミノ酸配列(LVHG)であることを確認した。

また、成熟型 SP59 タンパク質の N 末端アミノ酸ロイシンが1つ欠失したアミノ酸配列(VHG)も同時に存在することが明らかとなった。

【0054】

(9)SP60 および SP67 の遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定

COLO201 細胞から、前述した方法と同様にして SP60 および SP67 の遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定を行ない、セリンプロテアーゼに特有の触媒三つ組残基(catalytic triad)を有する SP60(配列番号:4)および SP67(配列番号:5)を得た。

これらの DNA は、SP59 と同様にして発現せしめ、セリンプロテアーゼを得ることができる。

【0055】

実施例 4. SP59 遺伝子の Northern ブロットによるヒト臓器での発現

pSPORT / SP59-#3 を制限酵素 Mlu I で消化し、約 1.4 キロ塩基対の DNA 断片を単離・精製し、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP(Amersham) で標識し、プローブとした。

このプローブと 16 種の臓器から調製した mRNA をブロッティングしたメンブランフィルター(クロンテック)を 65 deg C で 2 時間反応させた。

【0056】

次に、このメンブランフィルターを 0.1% SDS を含む 2 × SSC (150mM NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム) で室温、20 分間、続いて、1 × SSC, 0.1% SDS に替え 65 deg C, 30 分間で 2 回洗い、BAS2000 用イメージングプレート(富士写真フイルム)に 30 分間露光させ、解析した。

その結果を図 1 に示した。

SP59 遺伝子のヒト臓器での mRNA の発現は、特に脳において強い発現を認め、約 1.4kb の大きさであった。

また、SP60 遺伝子および SP67 遺伝子について、SP59 遺伝子と同様に試験を行った結果、それぞれ結腸、前立腺、小腸および腎、並びに結腸、小腸、前立腺および脾臓に強い発現を認め

Hood, L.E., & Dreyer, W.J. (1981) Journal of Biological Chemistry (0021 - 9258, JBCHA3 ). 256, 7990 - 7997) of 120 Aonline system of the Applied Biosystems .

As a result, mature type N-terminal amino acid sequence of SP59protein , as presumed, verified that it isa amino acid sequence (LVHG) .

In addition, N-terminal amino acid leucine of mature type SP59protein one also amino acid sequence (VHG ) which is deficient existing simultaneously became clear.

【0054】

(9) SP60 and cloning of gene of SP67 and identification of protein

cloning of gene of SP60 and SP67 and identification of the protein were done from COLO201 cell , to similar to method which is mentioned earlier, SP60 which possesses catalyst three group residue (catalytic triad ) which is peculiar to serine protease (Sequence Number :4 ) and SP67 (Sequence Number :5 ) was acquired.

These DNA revealing, in same way as SP59 can acquire the serine protease .

【0055】

With Northern blot of Working Example 4. SP59gene revelation with human organ

digestion it did pSPORT / SP59-#3 with restriction enzyme Mlu I , isolation and purification did DNA fragment of approximately 1.4 kilobase-pair , the;al -<sup>32</sup>Pd CTP labelling did with (Amersham ),made probe .

membrane filter (Clontech Laboratories, Inc. ) which mRNA which is manufactured from organ of this probe and 16 kinds blotting is done 2 hours it reacted with 65 deg C.

【0056】

Next, room temperature , 20min , continuously, it changed this membrane filter into 1 X SSC, 0.1 % SDS with 2 X SSC (150 mM NaCl, 15mM sodium citrate ) which include 0.1% SDS and twice washed with 65 deg C, 30min ,30 min exposed to imaging plate (Fuji Photo Film Co. Ltd. (DB 69-053-6693 ) ) for BAS2000 , analyzed.

Result was shown in Figure 1 .

Revelation of mRNA with human organ of SP59gene recognized strong revelation in especially brain , it was a size of approximately 1.4 kb .

In addition, result of testing in same way as SP59gene concerning SP60gene and SP67gene , recognized respective colon , prostate , small intestine and revelation which is strong in kidney , and colon , small intestine , prostate and the

た。

【0057】

実施例 5. SP59 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

(1)発現プラスミドの構築

pSPORT / SP59-#3 を Mlu I で消化後、約 1.4 キロ塩基対の DNA 断片を単離・精製し、TE に溶解した。

同様に、SV40 プロモーターをもつ pdKCR ベクター (Nikaido, T. ら、Nature, 311, 631-635(1984):pKCR ベクターの pBR322 部分が pBR327 に置換したベクター)も Mlu I にて消化後、アルカリホスファターゼにより脱リン酸化し、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1) 抽出を行い、エタノール沈殿し TE に溶解した。

【0058】

常法に従い、pSPORT / SP59-#3 の DNA 断片と pdKCR ベクターDNA 断片をライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換させ、生じたコロニーを PCR 法により解析して目的とするセリンプロテアーゼ SP59 発現プラスミド pdKCR / SP59 を得た。

次に、トリプシン II の開始メチオニンに続くシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を増幅し、かつ 5' 側上流に Eco RI, 3' 側下流に Bsp MI 制限酵素認識部位を付加するようにプライマーを設計した。

KY239 および KY240 を、配列番号:9 および 10 に示す。

【0059】

これらプライマーKY239 および KY240 を用い、pCR II/Trypsin II プラスミド(2つの特異的プライマー(Emi, M., Nakamura et al., Gene, 41, 305-310, 1986)を用いて実施例 3(2)工程 5 で得られた cDNA ライブラリーより増幅し、pCRII ベクターにサブクローニングして得た)をテンプレートとした PCR を行い、その産物を制限酵素(Eco RI および Bsp MI) で消化後、約 75bp の DNA 断片を単離・精製した。

【0060】

同様に、SP59 遺伝子の成熟タンパク質をコードする遺伝子の上流に Bsp MI 制限酵素認識部位を付加するようにプライマーKY241、および KY207 を設計した。

pancreas .

【0057】

Working Example 5. SP59gene code measurement of enzyme activity of novel serine protease mature protein which is done

Construction of (1) expression plasmid

pSPORT / SP59-#3 after digestion, isolation and purification it did DNA fragment of approximately 1.4 kilobase-pair with Mlu I, melted in TE.

In same way, dephosphorylation it did also pdKCR vector (Nikaido, T. and others and Nature (London) (0028 - 0836), vector which pBR322 portion of 311,631 - 635 (1984):pKCR vector substitutes in pBR327) which has the SV40promoter with Mlu I after digestion, with alkaline phosphatase, did phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24: 1)extraction, ethanol precipitation did and melted in TE.

【0058】

In accordance with conventional method, ligation doing DNA fragment and pdKCR vector DNA fragment of pSPORT / SP59-#3, transformation doing E. coli JM109, analyzing colony which it occurs with PCR method it acquired serine protease SP59expression plasmid pdKCR / SP59 which it makes objective .

Next, gene which signal sequence and enterokinase recognition sequence which follow the start methionine of trypsin (EC 3.4.21.4) II code is done amplifying was done, at same time in order to add Bsp MI restriction enzyme recognition site to EcoRI, 3' side downstream in 5' side upstream, primer was designed.

KY239 and KY240, are shown in Sequence Number :9 and 10.

【0059】

Making use of these primer KY239 and KY240, PCR which designates pCR II/Trypsin II plasmid (amplifying it did from cDNA library which is acquired with Working Example 3 (2) step 5 making use of 2 specific primer (Emi, M., Nakamura et al., Gene (0378 - 1119, GENED6), 41.305 - 310 and 1986) subcloning did in pCRII vector and acquired) as template was done, product after digestion, the DNA fragment of approximately 75 bp isolation and purification was done with restriction enzyme (EcoRI and Bsp MI).

【0060】

In order in same way, to add Bsp MIrestriction enzyme recognition site to upstream of gene which mature protein of SP59gene code is done, primer KY241, and the KY207 were designed.

KY241 および KY207 は、配列番号:11 および 12 に示した。

これらプライマーKY241 および KY207 を用い、pSPORT / SP59-#3 プラスミドをテンプレートとした PCR を行い、その産物を制限酵素(Bsp MI および Bpu 1102I)で消化後、DNA 断片を単離・精製した。

次に、得られたトリプシン II のシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする DNA 断片と SP59 遺伝子の成熟タンパク質をコードする DNA 断片を、常法に従い、制限酵素 (Eco RI および Bpu 1102I) で前消化した pdKCR/SP59 ベクターにライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換させた。

形質転換したコロニーのうち目的のキメラ遺伝子を含むコロニーを PCR 法により確認し、目的とするキメラ遺伝子 (Trp59) の発現プラスミド (pdKCR/Trp59) を得た。

【0061】

(2)COS-1 細胞における発現

実施例 5(1)で作製したキメラ遺伝子(Trp59) の発現プラスミドを用いて、動物細胞での発現を試みた。

発現用動物細胞として COS-1 細胞を用い、リポフェクション法により発現プラスミドとして pdKCR/Trp59 及び pdKCR をそれぞれトランスフェクションした。

すなわち、直径 10cm の培養用ディッシュ (Corning, 430167) に COS-1 細胞を  $1 \times 10^6$  細胞を植え込んだ。

培地としては、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, 日水製薬) を用いた。

【0062】

翌日、Opti-MEM 培地(Life Technologies) 5ml で細胞をリンスした後、さらに、5ml の Opti-MEM 培地を加え、37 deg C で 2 時間培養した。

培養後、ディッシュ 1 枚あたり上述のプラスミド 1  $\mu$ g およびリポフェクション(ファルマシア)10  $\mu$ g の混液を加え、さらに、37 deg C で 5 時間培養した。

培養後、Opti-MEM 培地を 5ml 加え、合計 10ml とし、37 deg C で 72 時間培養した。

培養後、遠心操作により培養上清を集め、酵素活性の測定サンプルとした。

It showed KY241 and KY207 , in Sequence Number :11 and 12.

Making use of these primer KY241 and KY207 , PCR which designates pSPORT / SP59-#3plasmid as template was done, product after digestion , DNA fragment isolation and purification was done with restriction enzyme (Bsp MI and Bpu 1102I ).

Next, with restriction enzyme (EcoRI and Bpu 1102I ) ligation it did in pdKCR/SP59vector which front digestion is done DNA fragment which mature protein of DNA fragment and SP59gene which signal sequence and enterokinase recognition sequence of trypsin (EC 3.4.21.4 ) II which isacquired code are done code is done, in accordance with the conventional method , transformation did E. coli JM109 .

colony which includes chimeric gene of inside objective of colony which transformation is done was verified by PCR method , expression plasmid (pdKCR/Trp59 ) of the chimeric gene (Trp59 ) which is made objective was acquired.

【0061】

Revelation in (2) COS-1 cell

Revelation with animal cell was tried making use of expression plasmid of the chimeric gene (Trp59 ) which is produced with Working Example 5 (1).

As animal cell for revelation pdKCR/Trp59 and pdKCR transfection weredone respectively making use of COS-1 cell , with Lipofectin method as the expression plasmid .

COS-1 cell  $1 \times 10^6$  cell was planted in D. Xu (Corning, 430167 ) for culture of the namely, diameter 10cm .

As culture medium , Dulbecco 's minimum essential medium (DMEM , Nissui Pharmaceutical Co. ) which includes 10% fetal calf serum was used.

【0062】

2 hours culture it did with 37 deg C next day , Opti-MEM culture medium (Life Technologies, Inc. ) rinse after doing the cell , furthermore, including Opti-MEMculture medium of 5 ml with 5 ml .

After culture , D. Xu per layer above-mentioned plasmid 1  $\mu$ g and the Lipofectin (Pharmacia ) including mixed solution of 10  $\mu$ g , furthermore, 5 hours culture itdid with 37 deg C.

After culture , 5 ml it added Opti-MEMculture medium , made total 10ml , 72 hour culture did with 37 deg C.

You gathered culture supernatant after culture , with centrifugation , made measurement sample of enzyme



活性の測定サンプルとした。

【0063】

### (3)酵素活性の測定

実施例 5(2)で得られた細胞培養上清中の酵素活性を測定した。

すなわち、COS-1 細胞の培養上清 50  $\mu$ l に エンテロキナーゼ (1 mg/ml, Biozyme Laboratories) 10  $\mu$ l を混和し、室温で 15 分間反応させた。

次に、DMSO に溶解した合成基質 Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (ペプチド研究所) を 0.1 M Tris/HCl, pH8.0 で希釈した 0.2 M 基質溶液を 50  $\mu$ l 加え、さらに、室温で 60 分間反応させた。

反応後、励起波長 485nm、蛍光波長 535nm における蛍光を測定した。

【0064】

その結果、図 2 に示したように、Trp59 遺伝子を発現した COS-1 細胞の培養上清にエンテロキナーゼを加えることにより酵素活性を認めた。

この結果、SP59 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質は、酵素活性を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、今回単離したセリンプロテアーゼ遺伝子は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼ遺伝子であることが明らかとなったばかりでなく、成熟タンパク質として活性を発現することが明らかとなった。

【0065】

### 【発明の効果】

本発明者らは、ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞から新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離し、かつ単離した遺伝子が成熟タンパク質としてセリンプロテアーゼ酵素活性を持っていることを明らかにした。

また、今回初めて得られた新規セリンプロテアーゼ遺伝子が結腸癌由来にもかかわらず、SP59 遺伝子は、ヒト脳に強く発現していることが明らかとなった。

【0066】

このように、癌細胞を用いたセリンプロテアーゼ遺伝子の単離は、新規遺伝子のリソースとして有用であることが明白である。

さらに、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離し

activity .

[0063]

### Measurement of (3) enzyme activity

enzyme activity in cell culture supernatant which is acquired with Working Example 5 (2) was measured.

enterokinase (1 mg/ml, Biozyme Laboratories) 10  $\mu$ l it mixed to culture supernatant 50  $\mu$ l of namely, COS-1 cell, 15 min reacted with room temperature .

Next, 50  $\mu$ l it added 0.2 M group quality solution which dilute the synthetic substrate Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (peptide research laboratory) which is melted in DMSO with 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, furthermore, 60 min reacted with room temperature .

After reacting, fluorescence in excitation wavelength 485nm, fluorescence wavelength 535nm was measured.

[0064]

As a result, as shown in Figure 2, enzyme activity was recognized by adding enterokinase to culture supernatant of COS-1 cell which reveals Trp59 gene .

this result, SP59 gene as for novel serine protease mature protein which code is done, showing enzyme activity became clear.

From result above, as for serine protease gene which this time is isolated, on primary structure, being a novel serine protease gene, it became clear to reveal activity not only becoming clear, as mature protein .

[0065]

### [Effects of the Invention]

these inventors isolated novel serine protease gene from COLO 201 cell of human colon cancer derivation, the gene which at same time is isolated made that it has serine protease enzyme activity as mature protein clear.

In addition, novel serine protease gene which this time is acquired for first time in spite of colon cancer derivation, as for SP59 gene, having revealed strongly in human brain became clear.

[0066]

this way, as for isolation of serine protease gene which uses cancer cell, it is clear to be useful as resource of novel gene .

Furthermore, assuming even when or that novel serine

たとしても、あるいは、単離した遺伝子を用いて mRNA の発現を検討したとしても、翻訳されたタンパク質が、その臓器局所で機能的に発現しているかどうかは、保証の限りではない。

## 【0067】

今回、前述した方法で新規セリンプロテアーゼ遺伝子を発現させ、機能的なタンパク質をコードすることを明らかにしたことは、当該遺伝子の有用性を証明するものである。

また、当該遺伝子を用いて発現したタンパク質が、機能的なタンパク質であることから、本酵素特異的阻害剤のスクリーニング系を確立することにより、各種疾患治療剤をスクリーニングすることが、初めて可能となる。

## 【0068】

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

配列

GTGCTCACNG

CNGCBCAYTG

20

## 【0069】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

配列

AGCGGNCCNC

CDGARTCVCC

20

## 【0070】

配列の長さ：1438

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

protease gene was isolated, assuming, that it examined revelation of mRNA, making use of gene which it isolates whether or not protein which translation is done, with organ topical has revealed in functional, it is not a limit of guarantee.

## 【0067】

This time, revealing novel serine protease gene with method which is mentioned earlier, what makes that code it does functional protein clear is something which proves usefulness of this said gene.

In addition, protein which is revealed making use of this said gene, the screening doing various disease treatment agent, for first time becomes possible from fact that it is a functional protein, by establishing screening system of this enzyme specific inhibitor.

## 【0068】

## 【0069】

## 【0070】

JP1997149790A

1997-6-10

配列

GGACACACGC TGTAGCTGTC TCCCCGGCTG GCTGGCTCGC TCTCTCCTGG GGACACAGAG 60 GTCGGCAGGC

【0071】

【0071】

【0072】

【0072】

【0073】

【0073】

配列の長さ: 699

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列

GTG	GTG	GGT	GGG	GAG	GAG	GCC	TCT	GTG	GAT	TCT	TGG	CCT	TGG	CAG	GTC		AGC	ATC	CAG
Val	Val	Gly	Gly	Glu	Glu	Ala	Ser	Val	Asp	Ser	Trp	Pro	Trp	Gln	Val		Ser	Ile	Gln
1				5					10					15					

**JP1997149790A**

**1997-6-10**

**JP1997149790A**

**1997-6-10**

【0074】

【0074】

【0075】

【0075】

配列の長さ: 723

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列

GTT	GTT	GGG	GGC	ACG	GAT	GCG	GAT	GAG	GGC	GAG	TGG	CCC	TGG	CAG	GTA	AGC	CTG	CA
Val	Val	Gly	Gly	Thr	Asp	Ala	Asp	Glu	Gly	Glu	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	His
1				5					10					15				

48

**JP1997149790A**

**1997-6-10**

**JP1997149790A**

**1997-6-10**



**JP1997149790A**

**1997-6-10**

**JP1997149790A**

**1997-6-10**

【0076】

【0076】

【0077】

【0077】

配列の長さ: 13

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:

配列

Leu	Arg	Gln	Arg	Glu	Ser	Ser	Gln	Glu	Gln	Ser	Ser	Cys
1				5					10			

【0078】

【0078】

配列の長さ: 15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:

配列

Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Ile	Gln	Pro	Leu	Pro	Leu	Glu	Arg	Asp	Cys
1				5					10					15

【0079】

【0079】

配列の長さ: 14

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類:

配列

Cys	Arg	Tyr	Thr	Asn	Trp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln	Ala	Lys
1				5					10				

【0080】

【0080】

配列の長さ: 26

JP1997149790A

1997-6-10

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成 DNA

配列

CACAGAATTC

CACCATGAAT

CTACTT

26

【0081】

【0081】

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成 DNA

配列

TAGCACCTGC

CGATCTTGTC

ATCATCA

27

【0082】

【0082】

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成 DNA

配列

GCAGACCTGC

AGAACAAGTT

GGTG CATG

28

【0083】

【0083】

配列の長さ: 18

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成 DNA

配列

AAAACCAGGG

AGAATCAG

18

【図面の簡単な説明】

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

【図 1】

[Figure 1]

Northern Blotting による SP59 遺伝子の各種ヒト臓器での発現をみた結果を示すニトロセルロース膜の図面に代わる写真である。

It is a photograph which is substituted to drawing of nitrocellulose membrane which shows result of looking at revelation with various human organ of SP59 gene with

ース膜の図面に代わる写真である。

PBL:peripheral blood lymphocyte(末梢リンパ球)

【図2】

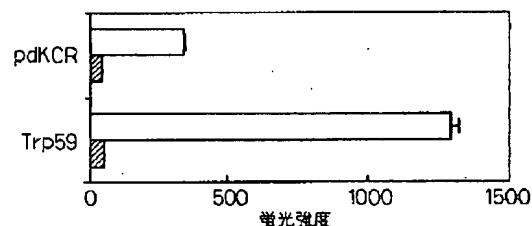
COS-1 細胞で発現した SP59 遺伝子のコードする成熟タンパク質の酵素活性を検討した結果を示す図である。

エンテロキナーゼを加えた場合を白のカラムで、また、エンテロキナーゼを加えない場合を斜線のカラムで示した。

なお、pdKCR は使用した発現用ベクターのみをトランスフェクションした COS-1 細胞の培養上清を示す。

Drawings

【図2】



【図1】

Northern Blotting .

PBL:peripheral blood lymphocyte (peripheral lymphocyte )

[Figure 2]

code of SP59gene which is revealed with COS-1 cell it is a figure which shows result of examining enzyme activity of mature protein which is done.

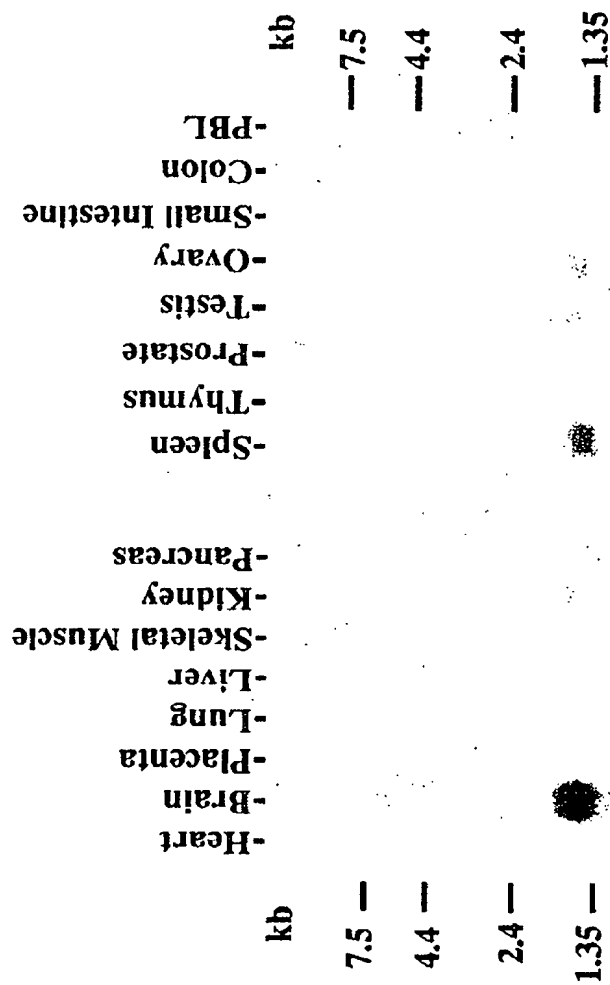
When enterokinase is added with column of white, in addition, case where enterokinase is not added was shown with column of slanted line .

Furthermore, pdKCR shows culture supernatant of COS-1 cell which only the expression vector which is used transfection is done.

[Figure 2]

[Figure 1]

## 図面代用写真



(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公 開 特 許 公 報 ( A )

(11) 特許出願公開番号

特開平9-149790

(43) 公開日 平成 9 年 (1997) 6 月 10 日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/47			C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
5/10			9/52	

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平8-212196	(71) 出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22) 出願日	平成8年(1996)7月24日	(72) 発明者	鶴岡 伸夫 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平7-275105	(72) 発明者	山城 恭子 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社生物医学研究所内
(32) 優先日	平7(1995)9月29日	(72) 発明者	辻本 雅文 埼玉県朝霞市三原町1丁目11番12号 ガー デンコート志木311
(33) 優先権主張国	日本 ( J P )	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規セリンプロテアーゼ

(57) 【要約】

【課題】 新規なアミノ酸配列の提供。

【解決手段】 配列番号：3に示すアミノ酸番号1～2

23のアミノ酸配列を有するセリンプロテアーゼ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：3に示すアミノ酸番号1から223までのアミノ酸配列（但し、アミノ酸番号1のロイシンは欠失していてもよい）、配列番号：4に示すアミノ酸番号1から233までのアミノ酸配列もしくは配列番号：5に示すアミノ酸番号1から241までのアミノ酸配列を含んで成るセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチド。

【請求項2】 配列番号：3に示すアミノ酸番号1から223までのアミノ酸配列（但し、アミノ酸番号1のロイシンは欠失していてもよい）、配列番号：4に示すアミノ酸番号1から233までのアミノ酸配列もしくは配列番号：5に示すアミノ酸番号1から241までのアミノ酸配列を含んで成るセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列番号：3のヌクレオチド番号219～887、同222～887、配列番号：4のヌクレオチド番号1～699もしくは配列番号：5のヌクレオチド番号1～723のヌクレオチド配列またはその部分ヌクレオチド配列を含んで成る、請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 請求項2又は3に記載のDNAを含んで成る組換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組換えベクターにより形質転換された宿主。

【請求項6】 請求項1に記載のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドの製造方法において、請求項5に記載の宿主を培養し、培養物から前記セリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを採取することを特徴とする方法。

【請求項7】 請求項1に記載のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを用いる阻害物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規セリンプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、及び該セリンプロテアーゼの製造方法、並びに該セリンプロテアーゼを用いる阻害物質のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】セリンプロテアーゼは、動物、植物、微生物に広く存在し、特に、高等動物では、食物の消化、血液凝固・線溶、補体活性化、ホルモン産生、排卵・受精、食作用、細胞増殖、発生・分化、老化、癌転移など極めて多くの生体反応に関与していることがわかっている(Neurath, H. Science, 224, 350-357, 1984)。また、高等動物におけるセリンプロテアーゼは、その活性中心の一次構造から、キモトリプシン族およびサブチリシン族に大別される。キモトリプシン族においては、その活性発現のために、活性中心のセリン残基のほかにヒ

スチジン残基が必須であり、また、セリン残基やヒスチジン残基の近傍のアミノ酸配列がよく保存されていることが知られている。

【0003】従って、これら保存された領域を使ってPCR法によりセリンプロテアーゼ遺伝子をクローニングする試みもなされている。すなわち、PCRプライマーとして、セリンプロテアーゼにおいてよく保存されているヒスチジン残基近傍のアラニン-アラニン-ヒスチジン-システイン(AAHC)ならびにセリン残基近傍のアスパラギン酸-セリン-グリシン-グリシン-プロリン(DSGGP)を用いて、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離したことが報告されている。

【0004】例えば、Sakanariらは、線虫および原虫からラットトリプシンIIと67%の類似性をもつセリンプロテアーゼ遺伝子を単離した(Sakanari, J. A., Staunton, C. E., Eakin, A. E., Craik, C. S. and McKerron, J. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4863-4867, 1989)。また、Mueller-Hillのグループは、ラット脾臓からラットトリプシンVおよびラットエラスターゼIVを単離し(Kang, J., Wiegand, U. and Mueller-Hill, B., Gene, 110, 181-187, 1992)、また、同じグループで、ヒト脳よりヒトトリプシンIVを単離した(Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J. and Mueller-Hill, B., Gene, 136, 167-175, 1993)。

【0005】しかしながら、これら先行文献においては、線虫や原虫ならびに脾臓や脳の組織由来のcDNAをもとに単離されている。また、このようなPCRプライマーを用いて単離されたセリンプロテアーゼ遺伝子は、ザイモゲンとして存在するため、セリンプロテアーゼ活性を持つタンパク質をコードする遺伝子であるかどうかの確認まで至っていないのが現状である。さらに、線虫や原虫ならびに臓器ばかりでなく、培養により増殖させることが可能な各種株化癌細胞のcDNAを使うことができれば、セリンプロテアーゼ遺伝子の単離がより容易になることは想像に難くないが、血清添加した培養細胞の上清ではセリンプロテアーゼ活性を測定することができないのが実状である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記の実情に鑑みてなされたものであり、その目的は新規なセリンプロテアーゼ、及びそれをコードする新規セリンプロテアーゼ遺伝子を提供することにある。さらに、本発明は当該遺伝子を用いて当該プロテアーゼを大量に生産する方法及び該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離するための出発材料として、ヒト結腸癌COLO 201細胞に着目した。すなわち、本発明者らは、COLO 201細胞を無タンパク質培地で培養



した培養上清中にセリンプロテアーゼ酵素活性を認め、このような新規セリンプロテアーゼ遺伝子の単離のためには、COLO 201細胞のような癌細胞から調製したcDNAを用いることが有効であることを発見した。かつ、単離した遺伝子が真に酵素活性をコードする遺伝子であるかどうかを確認するために、成熟タンパク質として発現することに成功し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0008】

【発明の実施の形態】ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞(ATCC CCL-224)は、動物細胞の培養に常用されている任意の方法により培養することができる。かつ、タンパク質を全く含まない培地を用いて静置培養することも可能である。具体例を実施例1に記載する。

【0009】培養上清中の酵素活性測定法は、市販の合成基質に7-アミノ-4-メチルクマリンやp-ニトロアニリドなどを結合させたものを用いて、容易に測定することができる。具体例を実施例2に記載する。この結果、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞の培養上清中には、明らかにセリンプロテアーゼ酵素活性を認めた。そこで、本酵素活性を含め、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞に発現しているすべてのセリンプロテアーゼ遺伝子を単離することを目的として、以下の実験を行った。すなわち、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞からmRNAを単離精製し、cDNAライブラリーを作製した。作製したcDNAライブラリーからセリンプロテアーゼモチーフをもとにデザインしたPCRプライマーを用いてPCRによるスクリーニングを行い、得られたPCR産物をサブクローニングした。

【0010】その結果、活性残基であるセリンおよびヒスチジン間にもセリンプロテアーゼに保存されているアミノ酸をコードする塩基配列を含むクローンが確認された。こうして得られた遺伝子をプローブとして、常法により全長の遺伝子をクローニングした結果、SP59遺伝子、SP60遺伝子およびSP67遺伝子を単離し、新規セリンプロテアーゼを確認することが出来た。具体例を実施例3に記載する。

【0011】以上の結果、本発明者らは、ヒト結腸癌由来COLO 201細胞のcDNAから、既知のセリンプロテアーゼと類似性が30%未満である新規セリンプロテアーゼ遺伝子(SP59遺伝子、SP60遺伝子およびSP67遺伝子)の単離に成功した。また、単離した新規セリンプロテアーゼ遺伝子をプローブとして、ヒト臓器でのmRNAの発現を確認したところ、SP59遺伝子、SP60遺伝子およびSP67遺伝子ともヒト臓器での発現が認められ、SP59遺伝子は特に脳において強い発現を認め、約1.4 kbの大きさであった。具体例を実施例4に記載する。このことから、単離された新規セリンプロテアーゼ遺伝子は、ヒト臓器でも発現していることが確認された。

【0012】また、単離した新規セリンプロテアーゼ遺伝子の構造から、成熟タンパク質として動物細胞で発現する方法を考案した。すなわち、代表的なセリンプロテ

アーゼであるトリプシンは、プロ体であるトリプシノーゲンとして発現した後、十二指腸粘膜に分布する酵素エンテロキナーゼの作用によりイソロイシンをN末端アミノ酸とする成熟活性タンパク質として存在することが知られている。

【0013】そこで、SP59遺伝子の成熟タンパク質をコードすると考えられる遺伝子の前にトリプシン遺伝子のシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を繋いだキメラ遺伝子(Trp59遺伝子)を作製した。作製したキメラ遺伝子であるTrp59遺伝子をCOS-1細胞にトランスフェクションした後、COS-1細胞の培養上清にエンテロキナーゼを作用させた結果、セリンプロテアーゼ酵素活性を確認した。具体的手法を実施例5に記載する。

【0014】以上の結果から、今回単離したセリンプロテアーゼ遺伝子は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼ遺伝子であることが明らかとなったばかりでなく、成熟タンパク質として活性を発現することが明らかとなった。本発明においては、新規セリンプロテアーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列として配列番号：3、4および5に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明のセリンプロテアーゼの遺伝子はこれに限定されない。一旦、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列が決定されれば、コドンの縮重に基き、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

【0015】本発明の天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子を得るには、実施例3に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然セリンプロテアーゼのアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子は、本発明に具体的に開示する戦略とは異なる戦略によりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

【0016】ゲノムからクローニングする場合、実施例3において使用した種々のプライマーヌクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のためプローブとして使用することができる。また、配列番号：3、4または5に記載するヌクレオチド配列に基づいて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的方法は当業界においてよく知られている(Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons社、第5章及び第6章)。

【0017】本発明の天然セリンプロテアーゼをコードする遺伝子はまた、化学合成によっても調製することが

できる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、配列番号：3、4および5に示されるヌクレオチド配列のDNAを容易に合成することができる。

【0018】本発明の天然型セリンプロテアーゼを生来のコドンとは異なるコドンによりコードする遺伝子は、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また配列番号：3、4または5に示すヌクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法（site-directed mutagenesis）等常法に従って得ることもできる（例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第8章を参照のこと）。

【0019】上記のようにして本発明のセリンプロテアーゼの遺伝子が得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換えセリンプロテアーゼを製造することができる。すなわち、本発明のセリンプロテアーゼをコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物（細胞又は培地）から目的とするセリンプロテアーゼを採取する。本発明のセリンプロテアーゼは、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N末端アシル化、例えばホルミル化、アセチル化などのC<sub>1-6</sub>アシル化または欠失等がされた形で得られてもよい。発現系は、シグナル配列の付加、改良や宿主の選択によって分泌効率及び発現量の向上を図ることもできる。シグナル配列の付加及び改良手段としては、他の構造ペプチドのシグナルペプチドをコードする遺伝子を本発明のセリンプロテアーゼの構造遺伝子の5'側上流に、切断可能な部分ペプチドをコードする遺伝子を介するように連結する方法が挙げられる。具体的例としては、実施例5に記載したトリプシン遺伝子のシグナル配列およびエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を用いる方法があげられる。

【0020】宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌（*Escherichia coli*）、バシルス属（*Bacillus*）細菌、例えばバシルス・ズブチリス（*B. subtilis*）等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス（*Saccharomyces*）属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞（*Spodoptera frugiperda*）、キャベツルーパー細胞（*Trichoplusia ni*）、カイコ細胞（*Bombyx mori*）、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等、具体的には、COS-1細胞、Vero細胞、CHO細胞、L細胞、ミエロー

マ細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞、Sp-2/O細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーパー等を用いることもできる。

【0021】発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス（バキュロ（昆虫）、ワクチニア（動物細胞））等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細胞に依存して選択され、例えば細菌用プロモーターとしてはlacプロモーター、trpプロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、adh1プロモーター、pqkプロモーター等が使用される。また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としてはSimian Virus 40のearlyもしくはlateプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターまたはSRαプロモーター等があげられる。また、発現ベクターには、以上の他にエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー（例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（メトトレキセート耐性）、neo遺伝子（G418耐性）等）等を含有しているのを用いるのが好ましい。なお、エンハンサーを使用する場合、例えばSV40のエンハンサー等を遺伝子の上流または下流に挿入する。

【0022】発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からのセリンプロテアーゼの精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

【0023】このようにして得られる本発明のセリンプロテアーゼは、機能的タンパク質であることから、本酵素を用いる本酵素特異的阻害物質のスクリーニングを可能とし、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索研究に有用である。スクリーニング方法の具体例として、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物のような、または、各種細胞培養上清等より得られる天然成分、各種合成化合物等の人工成分のような被験試料の本酵素阻害活性を、実施例2と同様にして、酵素活性の測定を行なうことにより行うことができる。また、本発明のセリンプロテアーゼの部分ペプチドまたは前記した本酵素の遺伝子もしくはその部分ペプチドをコードするDNAで形質転換された宿主もしくはその細胞膜画分を使用する上記酵素活性測定、結合親和性測定等も本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様である。

【0024】すなわち、本発明のセリンプロテアーゼは、その部分ペプチドとして本発明のスクリーニング方法に用いることができる。また、本発明のスクリーニング方法においては、本発明のセリンプロテアーゼをコードする遺伝子またはその部分ペプチドをコードするDNAを含んで成る組換えベクターにより形質転換され、本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを発現する宿主細胞またはその細胞膜画分を使用してもよい。

【0025】この場合の部分ペプチドとしては、活性部位のセリン残基の近傍に存在するペプチド断片および例えば実施例3（6）に用いたような本発明のセリンプロテアーゼに特異的な抗体の認識部位となり得るペプチド断片などの本発明のセリンプロテアーゼに特有の領域からなるペプチド断片を挙げることができる。なお、該部分ペプチドの作成は、本発明のセリンプロテアーゼについて前記した方法またはそれ自体公知のペプチドの合成法もしくは適当なプロテアーゼによる該セリンプロテアーゼの切断により行なうことができる。

【0026】また、上記の細胞膜画分は、本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドをコードするDNAを発現し得る宿主細胞を、発現が可能な条件下培養し、得られたセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを含有する宿主細胞をそれ自体公知の方法で破碎した後、得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。

【0027】本発明のセリンプロテアーゼまたはその部分ペプチドを用いる阻害物質のスクリーニング方法は、本発明のセリンプロテアーゼもしくはその部分ペプチドまたは該セリンプロテアーゼもしくはその部分ペプチドを含有する宿主細胞もしくはその細胞膜画分を用いて、被検試料をスクリーニングすることにより行なわれる。具体的方法として、本発明のセリンプロテアーゼおよびその部分ペプチドの基質、例えば、発色基質等の合成基質、放射性核種により標識された基質等、を用いる酵素活性測定法や結合親和性測定法により行なわれる。なお、セリンプロテアーゼを含有する宿主細胞を用いる場合、それ自体公知の方法で細胞を固定化（グルタルアル

デヒド、ホルムアルデヒド等で）して用いることができる。

【0028】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を説明する。

#### 実施例1. ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞の培養と培養上清の調製

ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞（ATCC CCL-224）を80 cm<sup>2</sup> の培養面積を持つTフラスコ（Nunc）で培養した。すなわち、Tフラスコあたり  $2 \times 10^6$  細胞を植え、10 %ウシ胎児血清（FBS, GIBCO BRL社）を含むRPMI-1640 培地（日本製薬）を用いて、コンフルエントになるまで培養した。次に、 $10^{-8}$ M 亜セレン酸ナトリウム（Sigma）含有タンパク質無添加 RPMI-1640培地に交換した。2週間培養後、培養上清を回収し、0.22  $\mu$ m の滅菌フィルター（Millipore）で濾過滅菌した後、培養上清中の酵素活性を測定する材料に供した。

#### 【0029】実施例2. ヒト結腸癌由来の COLO 201 細胞の培養上清中の酵素活性の測定

実施例1で得られた培養上清中のセリンプロテアーゼ酵素活性は、テストチーム発色基質S-2251（H-D-バリル-L-ロイシル-L-リジル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩、第一化学薬品）を用いて測定した。すなわち、精製水で1 mg/ml に溶解したテストチーム発色基質S-2251 50  $\mu$ l、0.1 M Tris/HCl（pH7.5）40  $\mu$ l および COLO 201 細胞の培養上清10  $\mu$ l を加え、室温で60分放置後、405 nmにおける吸光度を測定した。

【0030】培養上清の代わりに培地を10  $\mu$ l 加えた時の吸光度をブランクとした場合、COLO 201 細胞の培養上清の吸光度は、0.42であった。また、別の基質 H-D-バリル-L-ロイシル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド・二塩酸塩（第一化学薬品）を用いても同程度の活性を示した。また、本測定系における各種プロテアーゼ阻害剤の効果をみた結果、COLO 201 細胞の培養上清中には明らかにセリンプロテアーゼ酵素活性があることが確認された（表1）。

【0031】

【表1】

阻 害 剤* 又 は 処 理		残存活性 (%)
アプロチニン	250 KIU/ml	0.4%
ロイペプチン	0.1 mM	0.7%
ベンズアミジン	1 mM	0.7%
pABSF <sup>1)</sup>	1 mM	1.4%
NEM <sup>2)</sup>	1 mM	100.0%
EDTA <sup>3)</sup>	1 mM	74.0%
トリトン	2.5%	61.1%
	0.25%	100.0%
SDS <sup>4)</sup>	0.2%	0.0%
加 熱	95℃、10分間	27.0%

\*ブレインキューベーション37℃、10分間

1) pABSF: 4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニル

フルオリド・HCl (和光純薬)

2) NEM: N-エチルマレイミド (Sigma)

3) EDTA: エチレンジアミン四酢酸 (Sigma)

4) SDS: ドデシル硫酸ナトリウム (Sigma)

### 【0032】実施例3. 新規セリンプロテアーゼ遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定

#### (1) COLO 201細胞 mRNA の単離精製

COLO 201細胞 mRNA の調製は、アイソジェン (日本ゼン) を用いて添付の文書に従って行った。すなわち、COLO 201細胞をTフラスコ (Nunc, 80cm<sup>2</sup>) でコンフルエントになるまで増殖させた後、Tフラスコあたり1 mlのアイソジェンを加えることにより細胞を溶解した。さらに、クロロホルム200  $\mu$ l を加えて攪拌し、15,000 rpm, 4℃で15分間遠心した。

【0033】遠心後、水相を回収し、回収した水相に500  $\mu$ l のイソプロパノールを加えて攪拌し、15,000 rpm, 4℃で30分間遠心した。得られた全 RNAの沈殿を400  $\mu$ lのジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理した蒸留水に溶解し、400  $\mu$ l の2×溶出緩衝液 (20mM Tris-HCl pH7.5, 2mM EDTA, 0.2% SDS)を加え混合した。さらに、500  $\mu$ l のOligotex-dT30 (日本ロッシュ) 懸濁液を加えて混合し、65℃で5分間加熱した。氷中で急冷後、130  $\mu$ l の5M NaCl を加えて37℃で10分間加温した。

【0034】加温後、15,000 rpm, 4℃で3分間遠心し、上清を取り除いた後、沈殿を500  $\mu$ l の洗浄緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1M NaCl) に懸濁し、さらに、15,000 rpm, 4℃で3分間遠心した。上清を取り除いた後、沈殿を400  $\mu$ l のDEPC処理

した蒸留水に懸濁した。65℃で5分間加熱した後、15,000 rpm, 4℃で3分間遠心し、上清を回収した。

【0035】この上清に20  $\mu$ l の5M NaCl、1 mlのエタノールを加え、攪拌後、15,000 rpm, 4℃で20分間遠心した。沈殿物を500  $\mu$ l の70%エタノールで洗い、軽く風乾後、10  $\mu$ l のDEPC処理した蒸留水に溶解した。この結果、Tフラスコ16本から約12  $\mu$ gの polyA<sup>+</sup> RNAを得た。

#### (2) cDNAライブラリーの調製

cDNAライブラリーの調製は、スーパー・スクリプト・プラスミド・システム (Super Script Plasmid System) (Life Technologies) を用いて行った。

#### 【0036】工程1. cDNA の合成

COLO 201細胞 mRNA 5  $\mu$ l (約6  $\mu$ g) にオリゴdT Not Iプライマー 2  $\mu$ l (1  $\mu$ g)を加え、70℃で10分間熱した後、氷中で急冷した。この熱変性mRNAに、4  $\mu$ l の5×First strand buffer (250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)、1  $\mu$ l の10mM dNTP, 2  $\mu$ l の0.1M DTT, DEPC処理した蒸留水および5  $\mu$ l (1000U)のSuper Script II RTを加え、37℃で1時間反応させた。

【0037】次に、この反応液に91  $\mu$ l のDEPC処理した蒸留水、30  $\mu$ l の5×Second strand buffer (100mM Tris-HCl pH6.9, 450mM KCl, 23mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>, 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、3  $\mu$ l の10mM dNTP, 1  $\mu$ l (10U)

のE.Coli DNAリガーゼ、4 $\mu$ l (40U) のE.Coli DNA polymerase および 1 $\mu$ l (2U)のE.Coli RNase Hを加え、16 $^{\circ}$ Cで2 時間反応後、2  $\mu$ l (10U) のT4 DNAポリメラーゼを加え16 $^{\circ}$ Cで5 分間反応させた。

【0038】さらに、この溶液に10 $\mu$ l の0.5M EDTA を加えて混合した後、150  $\mu$ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、攪拌後15,000rpmで5 分間遠心し、上清を回収した。得られた上清に、10 $\mu$ l の5M KOAc, 400 $\mu$ l のエタノールを加え攪拌し、15,000 rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を500  $\mu$ l の70% エタノールで洗い、軽く風乾後、25 $\mu$ l のDEPC処理した蒸留水に溶解した。

【0039】工程2. Sal I アダプターの付加  
工程1で得られた2 本鎖cDNA 25  $\mu$ l に10 $\mu$ l の5 $\times$ T4 DNA リガーゼ緩衝液(250mMTris-HCl pH7.6, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ATP, 5mM DTT, 25% (w/v), PEG 8000), Sal I アダプター溶液10 $\mu$ l (10  $\mu$ g) および 5 $\mu$ l (5U)のT4 DNAリガーゼを加え、16 $^{\circ}$ Cにて16時間反応後、50 $\mu$ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)を加え、攪拌後15,000 rpmで5 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に、5  $\mu$ l の5M KOAc, 125 $\mu$ l のエタノールを加え攪拌し、-80 $^{\circ}$ C, 20分間冷却後、15,000 rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を200  $\mu$ l の70% エタノールで洗い、軽く風乾後、40 $\mu$ l のDEPC処理した蒸留水に溶解した。

【0040】工程3. 制限酵素Not I による切断  
工程2の反応液20 $\mu$ l にNot I 4  $\mu$ l (60U)を加え、37 $^{\circ}$ Cで3 時間反応後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1) 抽出を行い、上清を回収した。この上清をクロマスピニン-1000 カラム (クロンテック) で1キロ塩基対以上のサイズを分画し50 $\mu$ l の溶出液を得た。

【0041】工程4. pSPORTベクターとのライゲーション  
サイズ分画したcDNA溶液 3 $\mu$ l にSal I およびNot I で消化したpSPORTベクター1  $\mu$ l (50ng;Life Technologies)を加え、さらに11 $\mu$ l のDEPC処理した蒸留水、4  $\mu$ l の5 $\times$ T4 DNAリガーゼ緩衝液および1  $\mu$ l の5 $\times$ T4 DNAリガーゼを加え、室温で3 時間反応させた。

【0042】反応後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1) 抽出を行い、5  $\mu$ l (5 $\mu$ g)の酵母tRNA、5 $\mu$ l の5M KOAc および 125 $\mu$ l のエタノールを加えて攪拌し、-80 $^{\circ}$ Cで20分間冷却後、15,000 rpmで10分間遠心した。遠心して得られた沈殿物を200  $\mu$ l の70% エタノールで洗い、軽く風乾後、5  $\mu$ l のTE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)に溶解した。

【0043】工程5. 大腸菌DH10B への形質転換  
工程4で得られたライゲーション後cDNAを大腸菌Electro MAX DH10B(F', mcrA,  $\phi$  80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139,  $\Delta$

(ara, leu)7697, galU, galK,  $\lambda^{-}$ , rpsL, nupG:Life Technologies)にエレクトロポレーション法により形質転換した。すなわち、50 $\mu$ l のDH10B 細胞に2 $\mu$ l のライゲーション後cDNAを加え、終容量26 $\mu$ l $\times$ 2本として、エレクトロポレーター (Bio-Rad) で400V, 330- $\mu$ Fの条件で実施した。

【0044】次に、4 mlのSOC 培地 (2%バクト・トリプトン, 0.5%バクト・酵母エキス, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mMグルコース) で大腸菌を回収し、37 $^{\circ}$ Cで1 時間振とう培養後、50 mg/mlのアンピシリンを含むLBプレート (1%バクト・トリプトン, 0.5%バクト・酵母エキス, 0.5% NaCl, 0.1% グルコース, 1.5%バクト・アガー) にまいて37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。その結果、約 1.1 $\times$  10<sup>6</sup>個のクローンを含むcDNAライブラリーが得られた。

【0045】(3) セリンプロテアーゼ保存領域を用いたPCR

活性残基 (His)近傍のアミノ酸保存領域を基に配列番号：1に示すオリゴマーKY185 を合成した。また、活性残基 (Ser)近傍のアミノ酸保存領域を基に配列番号：2に示すオリゴマーKY189 を合成した。実施例3 (2) 工程3. で得られたcDNAをテンプレート、オリゴマーKY185 - KY189 をプライマーとして、Ampli-Taqポリメラーゼ (パーキンエルマー社) にてPCR を行った。このPCR 反応液をpCR IIベクター (インビトロジェン) にサブクローニングし、431 塩基対のDNA 断片を持つクローンを得た。これらクローンのシーケンスを行った結果、2つの活性残基 (His, Ser) の間にあるセリンプロテアーゼに保存されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことが確認された。

【0046】(4) セリンプロテアーゼのスクリーニング

前記実施例3.(3) で得られたプラスミドをテンプレートとしたPCR により、蛍光標識プローブを作成した。このプローブを用い、実施例3 (2) 工程5. で得られた約110 万クローンのcDNAライブラリーを常法によりスクリーニングした。その結果、約20万個から6 個の陽性クローンを得た。挿入DNA 断片の大きさを調べ、最長のクローンpSPORT / SP59-#3 (約1.4 キロ塩基対)を選び、本遺伝子のシーケンスをTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)で決定した。

【0047】(5) 塩基配列の特徴

pSPORT / SP59-#3のcDNAの塩基配列を配列番号：3に示す。その結果、pSPORT/ SP59-#3のcDNAの全長は1,438 塩基対で、155 塩基対の5' 非翻訳領域、732 塩基対の翻訳領域、551 塩基対の3' 非翻訳領域から成る。翻訳領域はアミノ酸244残基をコードしていることが明らかとなった。

【0048】(6) SP59タンパク質のペプチドフラグメ

#### ントに対する抗体の作製

SP59のアミノ酸配列のうち、配列番号：6の部分ペプチド（配列番号：3のアミノ酸番号56～67にCysを付加したもの）、配列番号：7の部分ペプチド（配列番号：3のアミノ酸番号96～110番）および配列番号：8の部分ペプチド（配列番号：3のアミノ酸番号210～223番）を合成して、純度90%以上の各部分ペプチドを得た。

【0049】各ペプチドフラグメントは、N-（ $\alpha$ -メレイドペンゾイルオキシ）スクシンイミド（MBS、ナカライテスク）で活性化したウシ血清アルブミン（BSA、ナカライテスク）に結合させて免疫した。すなわち、5mgのBSAを50mMリン酸緩衝液（pH8.0）に溶解した後、DMSOに溶解したMBSを1.25mg加え、室温で30分間攪拌し、MBS活性化BSAを得た。次に、MBS活性化BSAに50mMリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した各ペプチドフラグメント5mgを加え、室温で3時間攪拌することによりカップリングした。カップリングした各ペプチドフラグメントをFreund完全アジュバント（ナカライテスク）と混和し、常法により抗血清を作製した。

【0050】（7）ヒト膵臓癌由来のHPC-Y3細胞培養上清からのSP59タンパク質の精製

実施例1と同様にして得られたHPC-Y3細胞培養上清の凍結乾燥品10mgを0.1MNaClを含む10mMTris/HCl、pH7.4に1mg/mlのように溶解し、4ml/分の流速でSuperose6（ファルマシア）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。各フラクションを（6）で得たSP59部分ペプチド抗体を用いたウェスタンブロットおよび合成基質（Boc-Phe-Ser-Arg-4-メチルルックマリルー7-アミド（以下、MCA）、Boc-Gln-Ala-Arg-MCA）を用いた酵素活性の測定を実施した。その結果、フラクション63-70に溶出した画分に活性を認め、同画分をMonoQカラム（ファルマシア）によるイオン交換クロマトグラフィーにそのままアブライした。

【0051】次に、MonoQカラム非結合画分をそのまま10mMリン酸緩衝液、pH6.8であらかじめ平衡化したヒドロキシアパタイトカラム（ペンタックス）にアブライしたのち、リン酸緩衝液のリニアグラジエントで溶出させたところ、活性画分は、150mM濃度のリン酸緩衝液で溶出した。ついで、20mMリン酸緩衝液、pH6.8であらかじめ平衡化したMonoSカラムにアブライし、0.1MNaCl濃度でシングルピークとして活性画分が溶出した。溶出画分をC4カラムで脱塩したのち、N末端アミノ酸分析に供した。

【0052】（8）N末端アミノ酸配列の分析  
SP59タンパク質のN末端アミノ酸配列分析を、以下の通り行った。すなわち、HPC-Y3細胞無タンパク質培養上清から、前述した方法で精製したSP59タンパク質を用いて、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行なった。電気泳動後、Matsudaira(Matsudaira, P. (1987) J. Biol. Chem. 262, 10035-10038)の方法に従ってPVD F膜に転写

した。さらに、Speicher(Speicher, D.W. (1989) "Techniques in Protein Chemistry"(Hugli, T.E. ed.), pp. 24-35. Academic Press, San Diego)の方法に従ってクーマシーブルー染色することによりSP59タンパク質を検出した。このSP59タンパク質染色画分を切り取り、十分に洗浄、風乾後、N末端アミノ酸配列分析の試料とした。分析には、アブライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) の477 A気相シーケンサーを用いた。

【0053】フェニルチオヒダントイン誘導体は、アブライド・バイオシステムズの120Aオンラインシステムの逆相HPLC(Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., & Dreyer, W.J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 7990-7997)によって同定した。その結果、SP59タンパク質の成熟型N末端アミノ酸配列は、推定された通り、アミノ酸配列(LVHG)であることを確認した。また、成熟型SP59タンパク質のN末端アミノ酸ロイシンが1つ欠失したアミノ酸配列(VHG)も同時に存在することが明らかとなった。

【0054】（9）SP60およびSP67の遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定

COL0201細胞から、前述した方法と同様にしてSP60およびSP67の遺伝子のクローニングおよびタンパク質の同定を行ない、セリンプロテアーゼに特有の触媒三つ組残基(catalytic triad)を有するSP60（配列番号：4）およびSP67（配列番号：5）を得た。これらのDNAは、SP59と同様にして発現せしめ、セリンプロテアーゼを得ることができる。

【0055】実施例4. SP59遺伝子のNorthernブロットによるヒト臓器での発現

pSPORT / SP59-#3を制限酵素Mlu Iで消化し、約1.4キロ塩基対のDNA断片を単離・精製し、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP(Amersham)で標識し、プローブとした。このプローブと16種の臓器から調製したmRNAをブロッティングしたメンブランフィルター（クロンテック）を65℃で2時間反応させた。

【0056】次に、このメンブランフィルターを0.1% SDSを含む2×SSC(150mM NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム)で室温、20分間、続いて、1×SSC, 0.1% SDSに替え65℃, 30分間で2回洗い、BAS2000用イメージングプレート（富士写真フィルム）に30分間露光させ、解析した。その結果を図1に示した。SP59遺伝子のヒト臓器でのmRNAの発現は、特に脳において強い発現を認め、約1.4kbの大きさであった。また、SP60遺伝子およびSP67遺伝子について、SP59遺伝子と同様に試験を行った結果、それぞれ結腸、前立腺、小腸および腎、並びに結腸、小腸、前立腺および膵臓に強い発現を認めた。

【0057】実施例5. SP59遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

（1）発現プラスミドの構築

pSPORT / SP59-#3をMlu Iで消化後、約1.4キロ塩基対

のDNA断片を単離・精製し、TEに溶解した。同様に、SV40プロモーターをもつpdKCRベクター(Nikaido, T.ら、Nature, 311, 631-635(1984):pKCRベクターのpBR322部分がpBR327に置換したベクター)もMlu Iにて消化後、アルカリホスファターゼにより脱リン酸化し、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)抽出を行い、エタノール沈殿しTEに溶解した。

【0058】常法に従い、pSPORT / SP59-#3のDNA断片とpdKCRベクターDNA断片をライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法により解析して目的とするセリンプロテアーゼSP59発現プラスミドpdKCR / SP59を得た。次に、トリプシンIIの開始メチオニンに続くシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードする遺伝子を増幅し、かつ5'側上流にEcoRI, 3'側下流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーを設計した。KY239およびKY240を、配列番号:9および10に示す。

【0059】これらプライマーKY239およびKY240を用い、pCR II/Trypsin II プラスミド(2つの特異的プライマー(Emi, M., Nakamura et al., Gene, 41, 305-310, 1986)を用いて実施例3(2)工程5で得られたcDNAライブラリーより増幅し、pCRIIベクターにサブクローニングして得た)をテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(EcoRIおよびBspMI)で消化後、約75bpのDNA断片を単離・精製した。

【0060】同様に、SP59遺伝子の成熟タンパク質をコードする遺伝子の上流にBspMI制限酵素認識部位を付加するようにプライマーKY241、およびKY207を設計した。KY241およびKY207は、配列番号:11および12に示した。これらプライマーKY241およびKY207を用い、pSPORT / SP59-#3プラスミドをテンプレートとしたPCRを行い、その産物を制限酵素(BspMIおよびBpu1102I)で消化後、DNA断片を単離・精製した。次に、得られたトリプシンIIのシグナル配列ならびにエンテロキナーゼ認識配列をコードするDNA断片とSP59遺伝子の成熟タンパク質をコードするDNA断片を、常法に従い、制限酵素(EcoRIおよびBpu1102I)で前消化したpdKCR/SP59ベクターにライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させた。形質転換したコロニーのうち目的のキメラ遺伝子を含むコロニーをPCR法により確認し、目的とするキメラ遺伝子(Trp59)の発現プラスミド(pdKCR/Trp59)を得た。

【0061】(2) COS-1細胞における発現  
実施例5(1)で作製したキメラ遺伝子(Trp59)の発現プラスミドを用いて、動物細胞での発現を試みた。発現用動物細胞としてCOS-1細胞を用い、リポフェクチン法により発現プラスミドとしてpdKCR/Trp59及びpdKCRをそれぞれトランスフェクションした。すなわち、直径10cmの培養用ディッシュ(Corning, 430167)にCOS-1細胞を $1 \times 10^6$ 細胞を植え込んだ。培地としては、10%

ウシ胎児血清を含むDulbecco's minimum essential medium (DMEM, 日本製薬)を用いた。

【0062】翌日、Opti-MEM培地(Life Technologies) 5mlで細胞をリンスした後、さらに、5mlのOpti-MEM培地を加え、37℃で2時間培養した。培養後、ディッシュ1枚あたり上述のプラスミド1 $\mu$ gおよびリポフェクチン(ファルマシア)10 $\mu$ gの混液を加え、さらに、37℃で5時間培養した。培養後、Opti-MEM培地を5ml加え、合計10mlとし、37℃で72時間培養した。培養後、遠心操作により培養上清を集め、酵素活性の測定サンプルとした。

#### 【0063】(3) 酵素活性の測定

実施例5(2)で得られた細胞培養上清中の酵素活性を測定した。すなわち、COS-1細胞の培養上清50 $\mu$ lにエンテロキナーゼ(1mg/ml, Biozyme Laboratories)10 $\mu$ lを混和し、室温で15分間反応させた。次に、DMSOに溶解した合成基質Boc-Phe-Ser-Arg-MCA(ペプチド研究所)を0.1M Tris/HCl, pH8.0で希釈した0.2M基質溶液を50 $\mu$ l加え、さらに、室温で60分間反応させた。反応後、励起波長485nm、蛍光波長535nmにおける蛍光を測定した。

【0064】その結果、図2に示したように、Trp59遺伝子を発現したCOS-1細胞の培養上清にエンテロキナーゼを加えることにより酵素活性を認めた。この結果、SP59遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質は、酵素活性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、今回単離したセリンプロテアーゼ遺伝子は、その一次構造上、新規セリンプロテアーゼ遺伝子であることが明らかとなったばかりでなく、成熟タンパク質として活性を発現することが明らかとなった。

#### 【0065】

【発明の効果】本発明者らは、ヒト結腸癌由来のCOLO 201細胞から新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離し、かつ単離した遺伝子が成熟タンパク質としてセリンプロテアーゼ酵素活性を持っていることを明らかにした。また、今回初めて得られた新規セリンプロテアーゼ遺伝子が結腸癌由来にもかかわらず、SP59遺伝子は、ヒト脳に強く発現していることが明らかとなった。

【0066】このように、癌細胞を用いたセリンプロテアーゼ遺伝子の単離は、新規遺伝子のリソースとして有用であることが明白である。さらに、新規セリンプロテアーゼ遺伝子を単離したとしても、あるいは、単離した遺伝子を用いてmRNAの発現を検討したとしても、翻訳されたタンパク質が、その臓器局所で機能的に発現しているかどうかは、保証の限りではない。

【0067】今回、前述した方法で新規セリンプロテアーゼ遺伝子を発現させ、機能的なタンパク質をコードすることを明らかにしたことは、当該遺伝子の有用性を証明するものである。また、当該遺伝子を用いて発現したタンパク質が、機能的なタンパク質であることから、本

酵素特異的阻害剤のスクリーニング系を確立することにより、各種疾患治療剤をスクリーニングすることが、初めて可能となる。

【0068】

【配列表】

配列番号：1

配列

GTGCTCACNG CNGCBCAYTG

20

【0069】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

AGCGGNCCNC CDGARTCVCC

20

【0070】配列番号：3

配列の長さ：1438

配列の型：核酸

配列

GGACACAGC TGTAGCTGTC TCCCCGGCTG GCTGGCTCGC TCTCTCCTGG GGACACAGAG 60

GTCGGCAGGC AGCACACAGA GGGACCTACG GGCAGCTGTT CCTTCCCCCG ACTCAAGAAT 120

【0071】

CCCCGGAGGC CCGGAGGCCT GCAGCAGGAG CGGCC ATG AAG AAG CTG ATG GTG 173

Met Lys Lys Leu Met Val

-20

GTG CTG AGT CTG ATT GCT GCA GCC TGG GCA GAG GAG CAG AAT AAG TTG 221

Val Leu Ser Leu Ile Ala Ala Ala Trp Ala Glu Glu Gln Asn Lys Leu

-15 -10 -5 -1 1

GTG CAT GGC GGA CCC TGC GAC AAG ACA TCT CAC CCC TAC CAA GCT GCC 269

Val His Gly Gly Pro Cys Asp Lys Thr Ser His Pro Tyr Gln Ala Ala

5

10

15

CTC TAC ACC TCG GGC CAC TTG CTC TGT GGT GGG GTC CTT ATC CAT CCA 317

Leu Tyr Thr Ser Gly His Leu Leu Cys Gly Gly Val Leu Ile His Pro

20

25

30

CTG TGG GTC CTC ACA GCT GCC CAC TGC AAA AAA CCG AAT CTT CAG GTC 365

Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Lys Pro Asn Leu Gln Val

35

40

45

TTC CTG GGG AAG CAT AAC CTT CGG CAA AGG GAG AGT TCC CAG GAG CAG 413

Phe Leu Gly Lys His Asn Leu Arg Gln Arg Glu Ser Ser Gln Glu Gln

50 55 60 65

AGT TCT GTT GTC CGG GCT GTG ATC CAC CCT GAC TAT GAT GCC GCC AGC 461

Ser Ser Val Val Arg Ala Val Ile His Pro Asp Tyr Asp Ala Ala Ser

70

75

80

CAT GAC CAG GAC ATC ATG CTG TTG CGC CTG GCA CGC CCA GCC AAA CTC 509

His Asp Gln Asp Ile Met Leu Leu Arg Leu Ala Arg Pro Ala Lys Leu

85

90

95

TCT GAA CTC ATC CAG CCC CTT CCC CTG GAG AGG GAC TGC TCA GCC AAC 557

Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu Arg Asp Cys Ser Ala Asn

100

105

110

【0072】

ACC ACC AGC TGC CAC ATC CTG GGC TGG GGC AAG ACA GCA GAT GGT GAT 605

Thr Thr Ser Cys His Ile Leu Gly Trp Gly Lys Thr Ala Asp Gly Asp

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA



115	120	125	
TTC CCT GAC ACC ATC CAG TGT GCA TAC ATC CAC CTG GTG TCC CGT GAG	653		
Phe Pro Asp Thr Ile Gln Cys Ala Tyr Ile His Leu Val Ser Arg Glu			
130	135	140	145
GAG TGT GAG CAT GCC TAC CCT GGC CAG ATC ACC CAG AAC ATG TTG TGT	701		
Glu Cys Glu His Ala Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Gln Asn Met Leu Cys			
150	155	160	
GCT GGG GAT GAG AAG TAC GGG AAG GAT TCC TGC CAG GGT GAT TCT GGG	749		
Ala Gly Asp Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly			
165	170	175	
GGT CCG CTG GTA TGT GGA GAC CAC CTC CGA GGC CTT GTG TCA TGG GGT	797		
Gly Pro Leu Val Cys Gly Asp His Leu Arg Gly Leu Val Ser Trp Gly			
180	185	190	
AAC ATC CCC TGT GGA TCA AAG GAG AAG CCA GGA GTC TAC ACC AAC GTC	845		
Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Glu Lys Pro Gly Val Tyr Thr Asn Val			
195	200	205	
TGC AGA TAC ACG AAC TGG ATC CAA AAA ACC ATT CAG GCC AAG	887		
Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Ala Lys			
210	215	220	
TGACCCTGAC ATGTGACATC TACCTCCCGA CCTACCACCC CACTGGCTGG TTCCAGAACG	947		
TCTCTCACCT AGACCTTGCC TCCCTCCTC TCCTGCCAG CTCTGACCCT GATGCTTAAT	1007		
AAACGCAGCG ACGTGAGGGT CCTGATTCTC CCTGGTTTAA CCCCAGCTCC ATCCTTGCAAT	1067		
CACTGGGGAG GACGTGATGA GTGAGGACTT GGGTCCTCGG TCTTACCCCC ACCACTAAGA	1127		
GAATACAGGA AAATCCCTTC TAGGCATCTC CTCTCCCCAA CCCTTCCACA CGTTTGATTT	1187		
CTTCTGCAG AGGCCAGGCC ACGTGTCTGG AATCCAGCT CCGCTGCTTA CTGTCGGTGT	1247		
CCCCTTGGGA TGTACCTTTC TTCCTGCAG ATTTCTCACC TGTAAGATGA AGATAAGGAT	1307		
GATACAGTCT CCATAAGGCA GTGGCTGTTG GAAAGATTAA AGGTTTCACA CCTATGACAT	1367		
ACATGGAATA GCACCTGGGC CACCATGCAC TCAATAAAGA ATGAATTTTA TTAACAAAAA	1427		
AAAAAAAAA A	1438		

【0073】配列番号：4

配列の長さ：699

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列	
GTG GTG GGT GGG GAG GAG GCC TCT GTG GAT TCT TGG CCT TGG CAG GTC	48
Val Val Gly Gly Glu Glu Ala Ser Val Asp Ser Trp Pro Trp Gln Val	
1 5 10 15	
AGC ATC CAG TAC GAC AAA CAG CAC GTC TGT GGA GGG AGC ATC CTG GAC	96
Ser Ile Gln Tyr Asp Lys Gln His Val Cys Gly Gly Ser Ile Leu Asp	
20 25 30	
CCC CAC TGG GTC CTC ACG GCA GCC CAC TGC TTC AGG AAA CAT ACC GAT	144
Pro His Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Arg Lys His Thr Asp	
35 40 45	
GTG TTC AAC TGG AAG GTG CGG GCA GGC TCA GAC AAA CTG GGC AGC TTC	192
Val Phe Asn Trp Lys Val Arg Ala Gly Ser Asp Lys Leu Gly Ser Phe	
50 55 60	
CCA TCC CTG GCT GTG GCC AAG ATC ATC ATC ATT GAA TTC AAC CCC ATG	240
Pro Ser Leu Ala Val Ala Lys Ile Ile Ile Ile Glu Phe Asn Pro Met	
65 70 75 80	
TAC CCC AAA GAC AAT GAC ATC GCC CTC ATG AAG CTG CAG TTC CCA CTC	288
Tyr Pro Lys Asp Asn Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Gln Phe Pro Leu	

	85	90	95	
【0074】	ACT TTC TCA GGC ACA GTC AGG CCC ATC TGT CTG CCC TTC TTT GAT GAG			336
	Thr Phe Ser Gly Thr Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Phe Phe Asp Glu			
	100	105	110	
	GAG CTC ACT CCA GCC ACC CCA CTC TGG ATC ATT GGA TGG GGC TTT ACG			384
	Glu Leu Thr Pro Ala Thr Pro Leu Trp Ile Ile Gly Trp Gly Phe Thr			
	115	120	125	
	AAG CAG AAT GGA GGG AAG ATG TCT GAC ATA CTG CTG CAG GCG TCA GTC			432
	Lys Gln Asn Gly Gly Lys Met Ser Asp Ile Leu Leu Gln Ala Ser Val			
	130	135	140	
	CAG GTC ATT GAC AGC ACA CGG TGC AAT GCA GAC GAT GCG TAC CAG GGG			480
	Gln Val Ile Asp Ser Thr Arg Cys Asn Ala Asp Asp Ala Tyr Gln Gly			
	145	150	155	160
	GAA GTC ACC GAG AAG ATG ATG TGT GCA GGC ATC CCG GAA GGG GGT GTG			528
	Glu Val Thr Glu Lys Met Met Cys Ala Gly Ile Pro Glu Gly Gly Val			
	165	170	175	
	GAC ACC TGC CAG GGT GAC AGT GGT GGG CCC CTG ATG TAC CAA TCT GAC			576
	Asp Thr Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Tyr Gln Ser Asp			
	180	185	190	
	CAG TGG CAT GTG GTG GGC ATC GTT AGC TGG GGC TAT GGC TGC GGG GGC			624
	Gln Trp His Val Val Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Gly Gly			
	195	200	205	
	CCG AGC ACC CCA GGA GTA TAC ACC AAG GTC TCA GCC TAT CTC AAC TGG			672
	Pro Ser Thr Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu Asn Trp			
	210	215	220	
	ATC TAC AAT GTC TGG AAG GCT GAG CTG			699
	Ile Tyr Asn Val Trp Lys Ala Glu Leu			
	225	230		

【0075】配列番号：5

配列の長さ：723

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列	
GTT GTT GGG GGC ACG GAT GCG GAT GAG GGC GAG TGG CCC TGG CAG GTA	48
Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val	
1	5
AGC CTG CAT GCT CTG GGC CAG GGC CAC ATC TGC GGT GCT TCC CTC ATC	96
Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile	
20	25
TCT CCC AAC TGG CTG GTC TCT GCC GCA CAC TGC TAC ATC GAT GAC AGA	144
Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Ile Asp Asp Arg	
35	40
GGA TTC AGG TAC TCA GAC CCC ACG CAG TGG ACG GTC TTC CTG GGC TTG	192
Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp Thr Val Phe Leu Gly Leu	
50	55
CAC GAC CAG AGC CAG CGC AGC GCC CCT GGG GTG CAG GAG CGC AGG CTC	240
His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly Val Gln Glu Arg Arg Leu	
65	70
AAG CGC ATC ATC TCC CAC CCC TTC TTC AAT GAC TTC ACC TTC GAC TAT	288
Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn Asp Phe Thr Phe Asp Tyr	

	85	90	95	
	GAC ATC GCG CTG CTG GAG CTG GAG AAA CCG GCA GAG TAC AGC TCC ATG			336
	Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met			
	100	105	110	
【0076】				
	GTG CGG CCC ATC TGC CTG CCG GAC GCC TCC CAT GTC TTC CCT GCC GGC			384
	Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly			
	115	120	125	
	AAG GCC ATC TGG GTC ACG GGC TGG GGA CAC ACC CAG TAT GGA GGC ACT			432
	Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr			
	130	135	140	
	GGC GCG CTG ATC CTG CAA AAG GGT GAG ATC CCG GTC ATC AAC CAG ACC			480
	Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr			
	145	150	155	160
	ACC TGC GAG AAC CTC CTG CCG CAG CAG ATC ACG CCG CGC ATG ATG TGC			528
	Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met Cys			
	165	170	175	
	GTG GGC TTC CTC AGC GGC GGC GTG GAC TCC TGC CAG GGT GAT TCC GGG			576
	Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly			
	180	185	190	
	GGA CCC CTG TCC AGC GTG GAG GCG GAT GGG CGG ATC TTC CAG GCC GGT			624
	Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly			
	195	200	205	
	GTG GTG AGC TGG GGA GAC GGC TGC GCT CAG AGG AAC AAG CCA GGC GTG			672
	Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val			
	210	215	220	
	TAC ACA AGG CTC CCT CTG TTT CGG GAC TGG ATC AAA GAG AAC ACT GGG			720
	Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly			
	225	230	235	240
	GTA			723
	Val			

【0077】配列番号：6

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

配列

Leu Arg Gln Arg Glu Ser Ser Gln Glu Gln Ser Ser Cys

1

5

10

【0078】配列番号：7

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

配列

Lys Leu Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu Arg Asp Cys

1

5

10

15

【0079】配列番号：8

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

配列

Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Ala Lys

1

5

10

【0080】配列番号：9

配列の長さ：26

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA

配列  
CACAGAATTC CACCATGAAT CTACTT

26

【0081】配列番号：10  
配列の長さ：27  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA

配列  
TAGCACCTGC CGATCTTGTC ATCATCA

27

【0082】配列番号：11  
配列の長さ：28  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA

配列  
GCAGACCTGC AGAACAAGTT GGTGCATG

28

【0083】配列番号：12  
配列の長さ：18  
配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA

配列  
AAAACCAGGG AGAATCAG

18

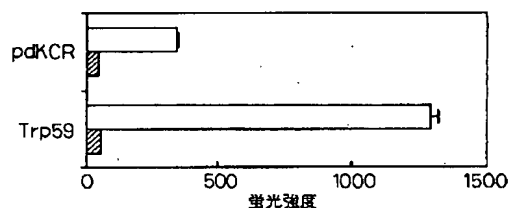
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】Northern Blotting によるSP59遺伝子の各種ヒト臓器での発現をみた結果を示すニトロセルロース膜の図面に代わる写真である。PBL:peripheral blood lymphocyte(末梢リンパ球)

【図2】COS-1 細胞で発現したSP59遺伝子のコードする

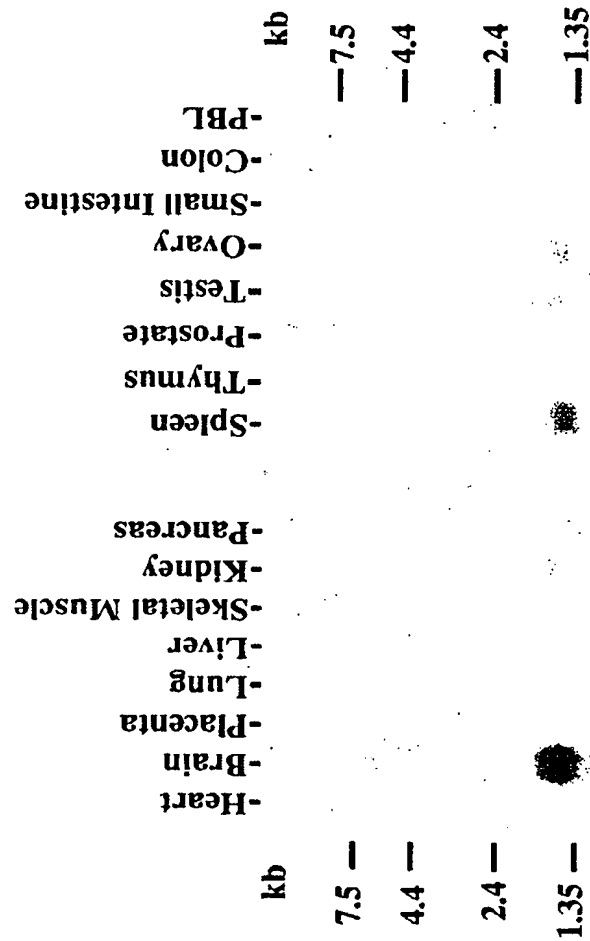
成熟タンパク質の酵素活性を検討した結果を示す図である。エンテロキナーゼを加えた場合を白のカラムで、また、エンテロキナーゼを加えない場合を斜線のカラムで示した。なお、pdKCR は使用した発現用ベクターのみをトランスフェクションしたCOS-1 細胞の培養上清を示す。

【図2】



【図1】

図面代用写真



フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/52			C 1 2 N 5/00	B
// A 6 1 K 38/46			A 6 1 K 37/54	
(C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 9/52				
C 1 2 R 1:19)				

(C 1 2 N 9/52  
C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 山口 希  
京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新  
御霊口町285－79